

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**Facultad de ciencias**  
**Departamento de Biología Molecular**

**Cambios en la fisiología de *Pseudomonas aeruginosa*  
causados por la sobre-expresión del sistema múltiple de  
bombeo MexEF-OprN.**

**Tesis Doctoral**

**Jorge Olivares Pacheco**

**Centro Nacional de Biotecnología**

**Madrid, 2013**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**Facultad de ciencias**  
**Departamento de Biología Molecular**  
**CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**

**Cambios en la fisiología de *Pseudomonas aeruginosa*  
causados por la sobre-expresión del sistema múltiple de  
bombeo MexEF-OprN.**

Memoria presentada por  
**Jorge Andrés Olivares Pacheco**  
Para optar al grado de Doctor en Biología Molecular  
por la Universidad Autónoma de Madrid

**Directores de Tesis:**

**Dr. José Luis Martínez Menéndez**

**Dra. Carolina Álvarez Ortega**





**A mi familia**



*“La selección natural, como veremos más adelante, es una fuerza siempre dispuesta a la acción y tan inconmensurablemente superior a los débiles esfuerzos del hombre, como las obras de la naturaleza lo son a las del arte”*

**“El Origen de las Especies”**

**Charles Darwin**

*“Nada en biología tiene sentido excepto a la luz de la evolución”*

**Theodosius Dobzhansky**



## Agradecimientos

Al Dr. José Luis Martínez por haber sido mi director de tesis estos años, por su constante apoyo y por todas las discusiones interesantes que hemos tenido. He aprendido mucho en este tiempo y esas enseñanzas espero plasmarlas en mi futuro como investigador y docente. Son pocos los que todavía no pierden el norte en creer que nada en biología tiene sentido si no se le mira desde el prisma de la evolución, tú eres uno de ellos. Gracias sinceras.

A la Dra. Carolina Álvarez por haber sido mi co-directora de tesis. Gracias por enseñarme el mundo de las *Pseudomonas*, un mundo totalmente desconocido para mí. Creo que me has entregado mucho en estos años y me faltarán palabras para agradecerte.

Al Dr. Fernando Rojo por ser mi tutor en la Universidad Autónoma de Madrid. Gracias también por todos los consejos y enseñanzas que me entregaste en los seminarios y por tus aportes a mi trabajo.

Al Dr. Alfonso Navas del departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, por mostrarme el mundo de *C. elegans* y por hacerme creer que todavía es posible ser un naturalista romántico en pleno siglo XXI.

A los servicios de genómica y proteómica del Centro Nacional de Biotecnología y a todo el personal técnico y administrativo del centro porque sin ellos nuestro trabajo sería muy difícil.

A mis compañeros de laboratorio del 212 y del 216, los que se fueron y los que están ahora:

A Alicia y Leonor, su ayuda fue fundamental en mis primeros pasos en el CNB. A Álvaro Hernández, por su humor incomparable que lo hace una persona totalmente fuera de serie. A Luis, que siempre ha creído que Chile es el mejor país del mundo, para que se lo voy a negar. A Blanca, que aunque se enfada, trata de mantener el orden en el laboratorio. A Felipão por esas conversaciones de metagenómica, plásmidos y de la vida tan enriquecedoras. A Fernando (Tuenti), ¡¡Que gusto me da discutir contigo!! (De cualquier cosa). Tus ideas y teorías son muy buenas y aunque sean locas o absurdas SIEMPRE hay que demostrarlas ¡¡Vivan los experimentos clase C!! (Que son los mejores creo yo). A Trini por toda la ayuda con el fermentador y por “rescatar” tantas cosas valiosas del 218 que me han servido para hacer algunos experimentos. A Renata, Pilar, Emma, Álvaro Viñas, Guillermo, Alejandra, Sofía y Ruggero gracias por sus consejos, sus ayudas, sus palabras de aliento y su espíritu.

A mis compañeros del máster que en estos años se han transformado en mi pequeña familia en España. Gracias por todos esos momentos juntos espero que nuestra amistad no sepa de fronteras.

A Jimena, mi compañera de la vida. Gracias por leer y corregir el manuscrito de la tesis unas 20 veces. Gracias por la comprensión. Gracias por todo ... Gracias totales.

A mi padres Lucas y María, a mi hermana Claudia, a mi abuelo Jorge y a mi tía Marcia por el constante apoyo desde tan lejos.



Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).

Durante el período 2008-2012 disfruté de una la beca del programa “Doctorado en el extranjero por gestión propia” Formación de Capital Humano Avanzado de la Comisión Nacional Científica y Tecnológica del Gobierno de Chile (CONICYT).





## ÍNDICE

---



<b>Índice.....</b>	<b>13</b>
<b>Summary.....</b>	<b>21</b>
<b>Abreviaturas usadas.....</b>	<b>25</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>29</b>
1.1. Resistencia a los antibióticos.....	29
1.2. Coste metabólico de la resistencia a los antibióticos.....	30
1.3. Contribución de las bombas de expulsión múltiple de drogas a la resistencia .....	32
1.3.1 Coste metabólico de la sobre-expresión de los sistemas múltiples de expulsión de drogas.....	34
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
1.4.1. Sistemas de expulsión múltiple de drogas en <i>P. aeruginosa</i> ...	35
1.5. Bases moleculares de la sobre-expresión del sistema Mex-EF-OprN en <i>P. aeruginosa</i> .....	38
1.5.1. Coste biológico y metabólico asociado a la sobre-expresión de MexEF-OprN y otras bombas en <i>P. aeruginosa</i> .....	38
1.6. Mecanismos de obtención de energía en <i>P. aeruginosa</i> .....	41
1.6.1. Respiración aeróbica.....	41
1.6.2. Mecanismos de generación de energía en condiciones anaeróbicas.....	42
1.6.3. Regulación de los mecanismos de obtención de energía.....	44
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>49</b>
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>53</b>
3.1. Cepas bacterianas y plásmidos.....	53
3.2. Medios y condiciones de cultivo.....	53
3.3. Determinación del coste biológico ( <i>fitness</i> ).....	53
3.4. Producción de elementos de virulencia.....	55
3.4.1. Producción de piocianina.....	55
3.4.2. Producción de proteasas.....	56
3.4.2.1. Caseinasa.....	56
3.4.2.2. Elastasa.....	56
3.4.3. Producción de Hemolisina.....	56
3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de SNP y GSNO.....	56
3.6. Técnicas de ADN.....	56
3.6.1. Técnicas generales.....	56
3.6.2. Reacción de PCR.....	57
3.7. Técnicas de ARN.....	57

3.7.1. Extracción de ARN.....	57
3.7.2. Experimentos de análisis transcriptómico.....	60
3.7.3. RT-PCR en tiempo real.....	61
3.8. Manipulaciones genéticas.....	61
3.8.1. Preparación de células competentes y transformación.....	61
3.8.2. Construcción del mutante de delección en el gen <i>nirS</i> en las cepas PT5 y PT149.....	61
3.8.3. Construcción de los mutantes de complementación de los genes <i>kynA</i> y <i>kynB</i> .....	62
3.9. Detección de los intermediarios de la síntesis de PQS.....	62
3.9.1. Extracción de PQS y HHQ.....	62
3.9.2. Detección de HHQ y PQS mediante cromatografía de capa fina..	63
3.9.3. Determinación de la presencia de kinurenina en el sobrenadante de cultivos mediante HPLC y espectrometría líquida de masas..	63
3.10. Ensayo de virulencia en el modelo de <i>C. elegans</i> .....	64
3.11. Cultivos suplementados con oxígeno.....	64
3.12. Medición del oxígeno.....	64
3.13. Medición de la concentración de NO y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en el medio.....	65
3.14. Obtención del medio LB carente de nitrato.....	65
4. Resultados.....	69
4.1. Caracterización de las cepas utilizadas en este trabajo.....	69
4.2. Estimación del coste de <i>fitness</i> relativo en el medio LB.....	70
4.2.1. Crecimiento en diferentes medios de cultivo.....	70
4.2.2. Ensayos de competición de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN con la cepa silvestre.....	70
4.3. Análisis del transcriptoma de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN en las distantes fases de crecimiento.....	71
4.3.1. Genes regulados diferencialmente en fase exponencial.....	72
4.3.2. Genes regulados diferencialmente en fase estacionaria.....	73
4.3.3. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de los resultados obtenidos en los ensayos de transcriptómica.....	76
4.4. Efectos de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre <i>quorum sensing</i>	79
4.4.1. Variación de los factores de virulencia.....	79
4.4.2. Alteración de la producción de PQS y HHQ en la cepa PT149.....	81
4.4.2.1. Restablecimiento de la producción de PQS en la cepa PT149 en presencia de antranilato.....	83
4.4.2.2. Recuperación de la expresión de los genes del regulón de de <i>quorum sensing</i> en presencia de antranilato.....	83

4.4.2.3. Análisis de la velocidad de crecimiento de la cepa PT149 utilizando intermediarios de la síntesis de HHQ y PQS como únicas fuentes de carbono.....	85
4.4.2.4. La sobre-expresión de <i>kynB</i> restablece la producción de PQS y los niveles de expresión de los genes de <i>quorum sensing</i> ....	86
4.5. Efectos de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	88
4.5.1. MexT regula la secreción de <i>P. aeruginosa</i> en forma independiente de MexEF-OprN.....	88
4.5.2. Cambios en la virulencia sobre <i>C. elegans</i> .....	89
4.6. Efectos de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre el metabolismo de generación de energía de <i>P. aeruginosa</i> .....	91
4.6.1. La cadena de respiración de nitrato se activa en condiciones aeróbicas en el mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN.....	91
4.6.2. El mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN es más sensible a los donadores de óxido nítrico: SNP y GSNO.....	92
4.6.3. Efectos de la sobre-expresión de las bombas MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY sobre la cadena respiratoria de nitrato en <i>P. aeruginosa</i> .....	93
4.6.4. Efecto de la sobre-expresión de AcrAB-TolC sobre la reducción de nitrito en <i>E. coli</i> K12.....	94
4.7. Efecto de la disponibilidad de oxígeno en los mutantes que sobre-expresan bombas tipo RND.....	96
4.7.1. Consumo de oxígeno de los mutantes de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> que sobre-expresan bombas tipo RND.....	96
4.7.2. Efectos de la adición de oxígeno en cultivos del mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN.....	96
4.7.3. Efecto de la adición de oxígeno sobre los genes expresados diferencialmente en la cepa PT149.....	98
4.7.4. Variación de la expresión de genes de la cadena respiratoria de nitrato bajo condiciones de aireación en el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN.....	99
4.8. Efecto de la delección del gen <i>nirS</i> sobre la cadena respiratoria de nitrato en la cepa PT149.....	100
4.8.1. La delección del gen <i>nirS</i> inhibe la cadena respiratoria de nitrato y recupera el fenotipo de sensibilidad a SNO en la cepa PT149....	100

4.8.2. La inactivación de la cadena respiratoria de nitrato en el mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN induce la vía de obtención de energía de la arginina deiminasa.....	101
4.9. Producción de óxido nítrico y consumo de nitrato en el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN.....	101
4.9.1. Los mutantes que sobre-expresan bombas RND producen mayor cantidad de NO.....	101
4.9.2. El consumo de nitrato aumento en los mutantes que sobre-expresan bombas RND.....	102
4.9.3. La presencia de nitrato es necesaria para evitar el coste de <i>fitness</i> causado por la sobre-expresión de la bomba MexEF-Oprn.....	103
5. Discusión.....	107
5.1. La sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN no causa un coste de <i>fitness</i> medido en experimentos clásicos de cálculo de crecimiento en diferentes medios y en experimentos con otras cepas.....	108
5.2 Distinción entre los genes cuya regulación depende de MexT de aquellos cuya regulación depende exclusivamente del funcionamiento de la bomba MexEF-OprN.....	108
5.3. Efecto de la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN sobre los elementos regulados por <i>quorum sensing</i> .....	110
5.4. Efecto de la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN sobre la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	112
5.5. <i>P. aeruginosa</i> activa la cadena respiratoria de nitrato en el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN.....	114
5.6. Efecto sobre el consumo de oxígeno de la sobre-expresión de las bombas de la familia RND.....	116
5.7. El consumo de nitrato desde el medio LB augiere que este elemento puede influir en el <i>fitness</i> de mutantes que sobre-expresan bombas de la familia RND.....	117
6. Conclusiones.....	121
7. Bibliografía.....	125
Anexo1.....	155
Anexo 2.....	175







## RESUMEN

---



## Summary

One paradigm on antibiotic resistance is that the acquisition of resistance may cause a fitness cost in the organism. In this doctoral thesis we have tested the alternative hypothesis that the acquisition of resistance not always produces a general metabolic burden in the microorganisms. We propose that this acquisition lead changes in the bacterial physiology, which can affect positively or negatively the fitness of bacteria, depending on environmental conditions. To investigate this possibility we use a multidrug efflux pump (MexEF-OprN) over-producer on *Pseudomonas aeruginosa* as a model. The over-expression of this system is caused by the mutation in *mexT*, the transcriptional activator of the *mexEF-OprN* genes. In order to analyze the physiological changes associated with the MexEF-OprN over-expression we considered five different aspects: (i) effects over the bacterial fitness, measured by classical experiments; (ii) changes in the *P. aeruginosa* transcriptomic profile; (iii) effects over the *quorum sensing* system; (iv) virulence and; (v) effects in the energy generation metabolism.

In this work we found that the over-expression of MexEF-OprN does not cause a decrease in *P. aeruginosa* fitness in classical competition tests performed in LB medium, indicating the absence of an important, non-specific, metabolic burden. The transcriptomic analysis revealed that the over-expression of MexEF-OprN results in reduced expression of several quorum sensing regulated genes and the reduction in the expression of the Type III and Type VI Secretion Systems is caused by the activation of MexT. Virulence factors regulated by quorum sensing like pyocyanin, elastase, caseinase and hemolysin decrease their production in the MexEF-OprN over-producer also. Previous works have described that RND-efflux pumps can extrude quorum sensing related molecules. We determine that the malfunctioning of the quorum sensing system is caused by the delay in PQS production due to over-extrusion of kinurenine, a PQS precursor, through the efflux pump.

Experiments in the *Caenorhabditis elegans* model demonstrated that over-production of MexEF-OprN impairs virulence in *P. aeruginosa*. This effect was mainly due to the decrease in the expression of quorum sensing virulence factors and not by the reduction in the expression of Type III and Type VI secretion systems, both regulated by MexT.

RND efflux pumps need the energy of the proton flux to work. Over-expression of these systems could cause an acidification of the cytoplasm. Increasing the oxygen respiration rate is the fastest way to eliminate the excess of protons. In this work we found that RND-efflux over-producers consume more oxygen compared with the wild type strain. The possible decrease in the oxygen concentration in the cytoplasm may activate other mechanisms of energy production normally activated under anaerobic condition like the nitrate respiratory chain.

The data obtained in this doctoral thesis indicate that the acquisition of antibiotic resistance can produce specific changes in the bacterial physiology and not necessarily imply a severe, non-specific cost in the fitness of organisms.



## **ABREVIATURAS**

---



## Abreviaturas

**AAC:** medio de cultivo que estimula la producción de piocianina  
**ABC:** del inglés “*ATP binding cassette*”  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario  
**AmpC:**  $\beta$ -lactamasa tipo C (cefalosporinasa)  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**ATP:** adenosín trifosfato  
**BHI:** medio infusión cerebro corazón  
**C4-HSL:** N-butiril-L-homoserín lactona. Molécula señal del sistema Rhl de QS de *P. aeruginosa*  
**CIO:** oxidasa terminal insensible a ácido cianhídrico  
**CMI:** concentración mínima inhibitoria  
**CYO:** oxidasa terminal  
**DO:** densidad óptica  
**EGTA:** ácido etilén glicol tetraacético  
**GSNO:** S-Nitroglutathione  
**HHQ:** 2-heptyl-4-hidroxy-quinolona  
**HPLC:** del inglés “*High-performance liquid chromatography*” (cromatografía líquida de alta eficiencia)  
**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido  
**LB:** medio Luria Bertani  
**MDR:** del inglés “*Multi Drug Resistance*” (Resistencia múltiple de drogas)  
**MFS:** del inglés “*Major Facilitator superfamily*”  
**pb:** pares de bases  
**PBPs:** del inglés “*Penicillin-Binding proteins*” (proteína de unión a penicilinas)  
**PBS:** tampón fosfato salino  
**PIA:** del inglés “*Pseudomonas Isolation Agar*” (medio de cultivo selectivo para *Pseudomonas spp*)  
**PQS:** del inglés “*Pseudomonas Quinolone Signal*” (2-heptyl-3hidroxy-4-quinolona)  
**RND:** del inglés “*Resistance nodulation division*”  
**SCFM:** medio sintético de esputo de enfermo de fibrosis quística  
**SMR:** del inglés “*Small multidrug family*”  
**SNP:** Nitroprusiato de Sodio  
**SST3:** sistema de secreción tipo III  
**SST6:** sistema de secreción tipo VI  
**TLC:** del inglés “*Thin layer chromatography*” (cromatografía en capa fina)  
**Tris-HCl:** tampón tris base (hidroximetil aminometano) más ácido clorhídrico.  
**UFC:** unidades formadoras de colonias





## INTRODUCCIÓN

---



# 1 Introducción

## 1.1 Resistencia a los antibióticos

Desde la Segunda Guerra Mundial los antibióticos han sido usados extensivamente para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. El éxito de estas drogas en el control de dichas enfermedades, ha contribuido de manera fundamental al aumento de la esperanza de vida de las personas. Actividades que actualmente se consideran rutinarias en un hospital como cirugías complejas, inmunosupresión para trasplantes, intubación o terapias anti-cáncer serían impensables sin el uso de antibióticos para prevenir o tratar la infección (Wilson, 2002). El uso de estos compuestos también se ha extendido a la ganadería, agricultura y acuicultura, tanto en el tratamiento de las enfermedades, como en su prevención (Cabello, 2006; McManus y cols., 2002; Singer y cols., 2003; Smith y cols., 2002). La masificación en el uso de los antibióticos en la clínica y a nivel veterinario, ha implicado que grandes cantidades de estos compuestos sean eliminadas con la consiguiente contaminación del medio natural (Hu y cols., 2010; Kümmerer, 2009a, b; Lindberg y cols., 2007; Martinez, 2009b; McArthur y Tuckfield, 2000; Yiruhan y cols., 2010). Esta contaminación y el manejo inadecuado de los antibióticos a nivel clínico han ayudado a que la aparición de resistencia en los microorganismos sea un problema de primera magnitud para la salud mundial (WHO, 2006). En los últimos 30 años la situación ha empeorado ostensiblemente ya que cada vez son más las especies bacterianas que presentan resistencia a algún antibiótico (Davies, 1994; Nikaido, 1994) y las nuevas drogas no son suficientes para contrarrestar la aparición de la resistencia (Davies, 1994). Actualmente se debe asumir que cuando un antibiótico es introducido al mercado, la aparición de cepas resistentes es sólo cuestión de tiempo (Palumbi, 2001).

La resistencia de un organismo a los antibióticos está constituida por la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida. La resistencia adquirida se define como la obtención de un mecanismo específico de resistencia contra un antibiótico o una familia de antibacterianos específica. Esta adquisición puede tener su origen en (i) una mutación, (ii) la recombinación de dos fragmentos del cromosoma o (iii) la transferencia horizontal de genes (Martinez y cols., 2009). El mecanismo de resistencia adquirido más extendido en las bacterias para las diferentes familias de antibióticos es la inactivación del compuesto activo por hidrólisis o por la formación de derivados inactivos del mismo (Davies, 1994). Un posible origen de estos genes de resistencia son las bacterias que producen los antibióticos, ya que son necesarios para evitar su “auto-envenenamiento” (Davies, 1994). Sin embargo, hasta la fecha, sólo se ha determinado el origen de dos de los genes de resistencia adquiridos por los patógenos humanos. En ambos casos se ha descrito que estos genes provienen de bacterias no productoras. Uno de ellos es el gen que confiere resistencia a quinolonas, *qnr* cuyo origen es la bacteria marina *Shewanella algae* (Nordmann y Poirel, 2005; Poirel y cols., 2005a; Poirel y cols., 2005b; Sanchez y cols., 2008). El segundo de ellos, que codifica la  $\beta$ -lactamasa CTXM, se encontró en el cromosoma de *Kluyvera ascorbata* (Canton y Coque, 2006; Humeniuk y cols., 2002). Esto indica que los genes de resistencia pueden provenir de bacterias no productoras de antibióticos y por tanto la variedad de potenciales donadores de genes de resistencia a los antibióticos es casi ilimitada. Estos genes pueden incorporarse en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones para luego diseminarse dentro de la misma población bacteriana e incluso en otras especies (Baquero y cols., 2008; Davies, 1994; Martinez, 2008). Algunos de ellos permanecen como elementos extra-cromosómicos, pero otros se integran en

el cromosoma (Davies, 1994).

Las mutaciones en los genes diana de los antibióticos son también importantes en la resistencia adquirida. Estas mutaciones consisten en la remodelación del sitio activo de una determinada enzima, cambiando la sensibilidad y el espectro de los antibióticos (Allen y cols., 2010). Un ejemplo de ello es la familia de las “*Penicillin-Binding proteins*” PBPs (Massova y Mobashery, 1998) donde una serie de mutaciones puntuales en el sitio activo de la proteína le permiten una gran versatilidad adaptativa en el fenotipo de resistencia (Ghuysen, 1994, 1997).

A diferencia de la resistencia adquirida, la resistencia intrínseca, está definida por aquellos elementos propios de la bacteria que no necesitan cambiar para conferir un fenotipo resistente. Entre estos elementos, encontramos las enzimas inactivantes de los antibióticos y las bombas de expulsión. Las enzimas inactivantes forman parte de la resistencia intrínseca, tanto de los organismos productores de antibióticos, como de los no productores. Estos genes de resistencia pueden integrarse en elementos móviles y pasar a otra especie bacteriana contribuyendo a su resistencia adquirida (Davies, 1994).

En lo que respecta a los sistemas de bombeo múltiple de drogas, estos contribuyen expulsando desde el interior de la bacteria una gran variedad de compuestos, de esta forma impiden que los antibióticos alcancen la concentración necesaria para actuar sobre sus dianas (Nikaido y Pages, 2012; Nikaido y Takatsuka, 2009; Nikaido y Zgurskaya, 2001). Pero no sólo las enzimas inactivantes y las bombas de expulsión contribuyen a la resistencia intrínseca. Fajardo, y cols. (2008) proponen que aquellos genes codificados en el cromosoma, que contribuyen a la resistencia, cuya presencia es independiente de una exposición anterior al antibiótico y no han sido adquiridos por transferencia horizontal, definen el “resistoma intrínseco” de una determinada especie.

La mayoría de la literatura relacionada con la resistencia a los antibióticos en el siglo XX se centró en la resistencia de los patógenos humanos clínicamente relevantes, olvidando un gran número de bacterias que causan enfermedades en los animales y las plantas así como en las bacterias no patógenas que habitan en el medio ambiente. Actualmente, la resistencia a los antibióticos es considerada como un sistema abierto, donde las bacterias del medio ambiente son el origen y reservorio de los genes de resistencia (Martinez, 2008; Martinez y cols., 2009) y su constante interacción con las bacterias patógenas es lo que otorga dinamismo al sistema (D’Costa y cols., 2007; Martinez, 2008; Wright, 2010). Los mecanismos de resistencia a los antibióticos se recogen en la figura 1.1.

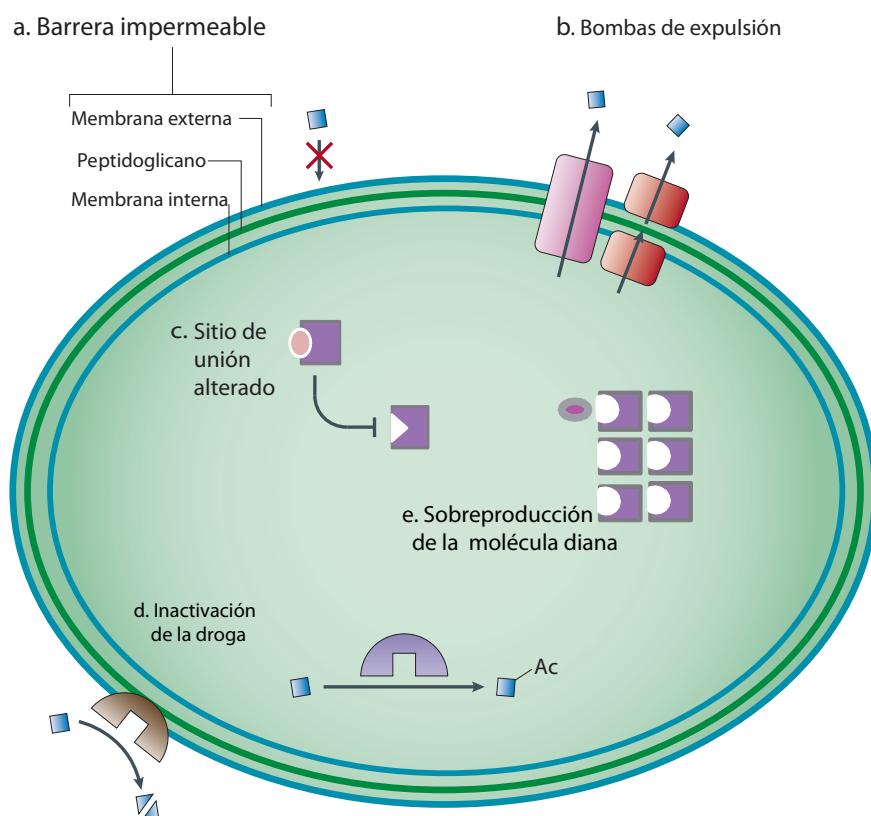
## 1.2 Coste metabólico de la resistencia a los antibióticos

Se ha indicado que la adquisición de resistencia a los antibióticos podría implicar un coste en la eficacia biológica de los organismos (Andersson y Levin, 1999), ya que algunas veces se ven afectados genes fundamentales para su normal funcionamiento. Lo más común es que estos cambios causen una “desadaptación” de la bacteria al ambiente en que se encuentra y las cepas resistentes podrían perder “eficacia biológica” (*fitness*) frente a sus contrapartes sensibles. Estas cepas menos eficientes serían eliminadas del medio por las más eficientes en un ambiente libre de antibióticos (Andersson, 2006).

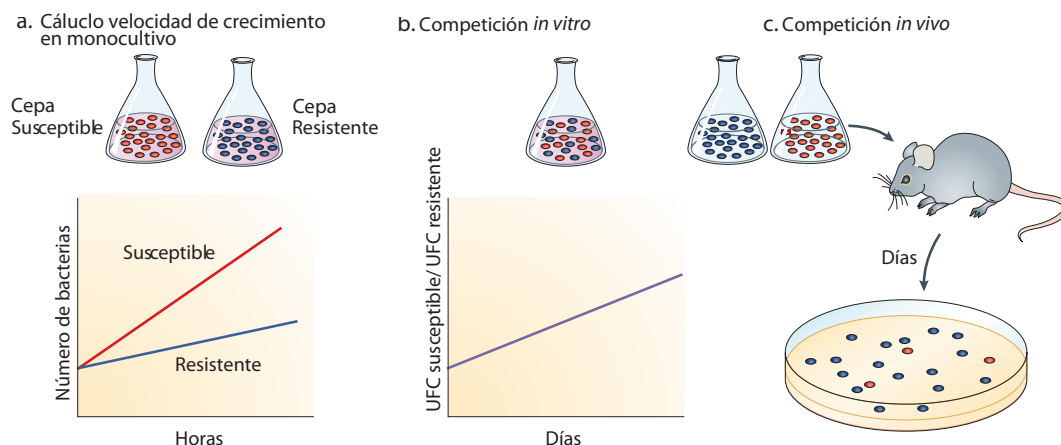
Es esta característica de pérdida de *fitness* donde se han centrado una parte de los estudios de resistencia a los antibióticos en los últimos años (Andersson y Hughes, 2010). Los métodos más utilizados para estimar el *fitness* son la comparación entre las tasas de crecimiento de la cepa silvestre con la cepa resistente y los experimentos de competición. Usando estos métodos se ha observado en algunos casos que la tasa de crecimiento se ve reducida en los individuos resistentes. Como

consecuencia de esta reducción, la bacteria resistente es desplazada de un medio sin antibióticos por la cepa silvestre (Alonso y cols., 2004; Andersson, 2003; Andersson y Levin, 1999; Hughes y Andersson, 2012; Linares y cols., 2005; Nilsson y cols., 2006; Pfister y cols., 2005; Wolter y cols., 2005). No obstante, estas características pueden ser enmascaradas bajo condiciones ideales de laboratorio. De esta forma cuando los aislados naturales o clínicos son llevados al laboratorio presentan comportamientos muy dispares al calcular el *fitness* (Andersson, 2006; Gillespie y cols., 2005) (Figura 1.2).

La pérdida de *fitness* es un problema que muchas veces es solventado por la célula con mutaciones que pueden compensar estas deficiencias en el metabolismo del organismo (Andersson y Hughes, 2010). Las mutaciones compensatorias pueden estabilizar a las poblaciones bacterianas en ausencia del antibiótico, eliminando el coste de *fitness* generado por la adquisición de resistencia. Estudios de evolución en cultivos de poblaciones resistentes han demostrado el restablecimiento de niveles de eficiencia metabólica similares a los de la cepa silvestre, sin perder los niveles de resistencia (Handel y cols., 2006; Levin y cols., 2000; Maisnier-Patin y cols., 2002).



**Figura 1.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos.** La mayoría de los antibióticos para que sean efectivos deben ingresar al interior de la célula de modo inespecífico, o bien por transportadores específicos. Ya en el citoplasma de la célula el antibiótico actúa sobre su diana. Algunos antibióticos necesitan enzimas intracelulares para su activación. La resistencia a los antibióticos se debe fundamentalmente a alteraciones en alguno de los pasos mencionados anteriormente. La primera forma de resistencia es impedir que el antibiótico ingrese al interior de la célula. **(a)** Tener una barrera casi impermeable a los antibióticos en la membrana de la bacteria, es uno de los mecanismos de resistencia intrínseca más importantes hasta ahora descritos. **(b)** Las bombas de expulsión son elementos de resistencia ampliamente distribuidos. Estas bombas expulsan al antibiótico al exterior de la célula impidiendo que este alcance una concentración que pueda ser letal para la bacteria. La modificación del sitio activo de la diana **(c)** o la inactivación de la droga **(d)** son las estrategias más ampliamente distribuidas en la resistencia a un antibiótico específico. La sobreproducción de la molécula diana también es utilizada por las bacterias como estrategia de resistencia **(e)**. Modificado de Allen y cols. (2010).



**Figura 1.2 Ensayos clásicos de determinación del coste de fitness.** (a) Comparación de la velocidad de crecimiento de la cepa susceptible y la cepa silvestre en un medio determinado. Estos experimentos sólo permiten determinar grandes diferencias en el fitness de los organismos. (b) Experimentos de competición *in vitro*. Un cultivo mixto entre la cepa susceptible y la cepa resistente es diluido cada día en medio fresco. La cepa más eficiente desplazará a la menos eficiente del medio. (c) Experimentos de competición *in vivo*. Un animal modelo es inoculado con un cultivo mixto de la cepa susceptible y la cepa silvestre y diariamente se mide la variación de las dos poblaciones. La cepa más eficiente en colonizar al huésped desplazará a la menos eficiente. Modificado de Andersson y Hughes (2010).

### 1.3 Contribución de las bombas de expulsión múltiple de drogas a la resistencia

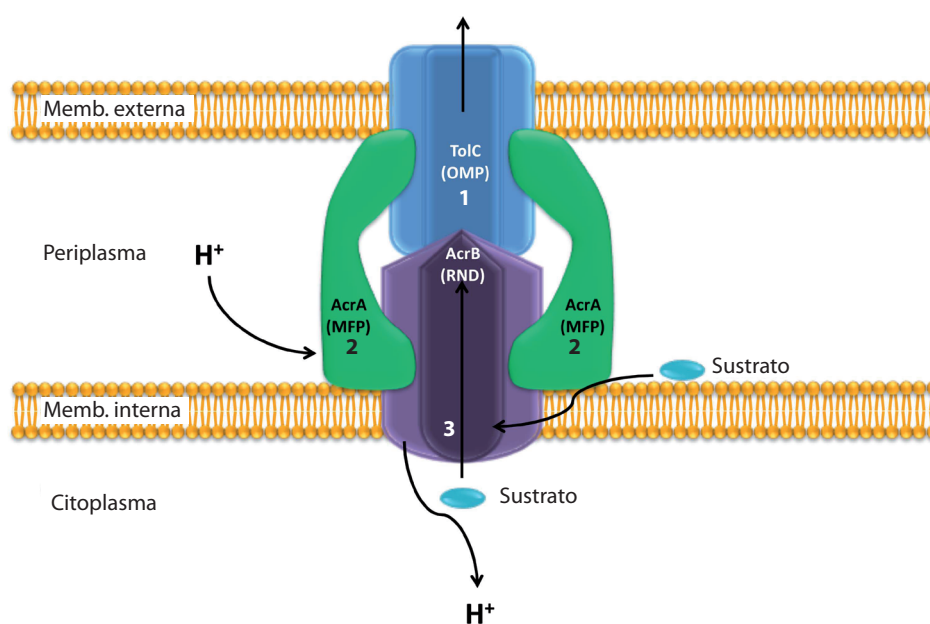
Uno de los elementos de resistencia a los antibióticos más ampliamente distribuidos en la naturaleza son las bombas de expulsión múltiple de drogas; sistemas MDR -del inglés *Multi Drug Resistance*- (Aires y cols., 1999; Nikaido, 1998). Estos sistemas MDR confieren resistencia a distintas sustancias tóxicas, desde drogas anti-cáncer (Wu y cols., 2011) y antifúngicas (Cannon y cols., 2009; Schuetzer-Muehlbauer y cols., 2003) en eucariotas; hasta los antibacterianos en procariotas (Li y Nikaido, 2004, 2009; Poole, 2005, 2007; Webber y Piddock, 2003). Estos determinantes de resistencia se encuentran codificados generalmente en el cromosoma de los organismos y sus componentes estructurales están muy conservados a través de diferentes taxones (Paulsen, 2003; Paulsen y cols., 2001; Saier y cols., 1998). Esta particular característica hace suponer que las bombas de expulsión son elementos ancestrales, presentes en las bacterias mucho antes de que aparecieran los antibióticos y su función original es muy distinta a la de expulsar estos fármacos (Martínez y cols., 2009).

Actualmente, las bombas de expulsión múltiple de drogas en procariontes se clasifican en cinco familias diferentes nombradas por sus siglas en inglés: MFS -*Major Facilitator superfamily*- (Pao y cols., 1998); MATE -*Multidrug y toxic compound extrusion*- (Kuroda y Tsuchiya, 2009); ABC -*ATP binding cassette*- (Lubelski y cols., 2007); SMR -*Small multidrug family*- (Chung y Saier, 2001); y RND -*Resistance nodulation division*- (Murakami y cols., 2006; Nikaido, 2011; Nikaido y Takatsuka, 2009). El funcionamiento de estas bombas es dependiente de energía, pero sólo las pertenecientes a la familia ABC necesitan directamente de ATP para hacerlo (Lubelski y cols., 2007). Las familias MFS, RND y SMR utilizan la energía generada por el flujo constante de protones en el sistema de membrana. Finalmente, los miembros de la familia MATE se valen de un sistema antitransportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  para expulsar los compuestos tóxicos (Piddock, 2006). De estas familias, la RND es la más frecuente en bacterias Gram-negativas, mientras que miembros de la familia MATE se encuentran usualmente en bacterias Gram-

positivas (Piddock, 2006; Vila y Martínez, 2008).

La regulación de la expresión de estos elementos puede ser variada, desde complejas cascadas de señales (Grkovic y cols., 2001, 2002), hasta regulación indirecta por reguladores globales (Martín y cols., 2008; Pérez y cols., 2012a; Zhang y cols., 2008). Sin embargo, lo más común es que un regulador transcripcional, generalmente un represor, controle directamente la expresión de estas bombas (Li y cols., 1995; Linares y cols., 2005; Poole y cols., 1993). Los represores mantienen a estos sistemas en niveles de expresión basales y su sobre-expresión depende de mutaciones de dichos reguladores y/o de la liberación de la represión debido a la unión de una molécula efectora (Hernández y cols., 2009; Hernández y cols., 2011).

Uno de los sistemas de bombeo mejor descrito es el AcrAB-TolC de *E. coli* (Blair y Piddock, 2009; Ma y cols., 1996; Ma y cols., 1995; Martins y cols., 2009; Nikaido y Zgurskaya, 2001; Pérez y cols., 2012a; Zgurskaya y Nikaido, 1999). Esta bomba es considerada el modelo de la familia RND (Nikaido y Takatsuka, 2009). Estructuralmente es un sistema tripartito (Murakami y cols., 2006; Murakami y cols., 2002; Nikaido, 2011), formado por (i) una proteína anclada a la membrana interna; AcrB; (ii) una porina ubicada en la membrana externa; TolC; y (iii) un canal que conecta ambas proteínas; AcrA (Figura 1.3). Con excepción de TolC, que se encuentra codificada en un *locus* diferente del cromosoma, las demás proteínas de la bomba AcrAB-TolC se encuentran codificadas en un mismo operón (Koronakis y cols., 2004).



**Figura 1.3. Esquema de la estructura del sistema MDR AcrAB-TolC de *E. coli*.** Este sistema pertenece a la familia RND cuya estructura se encuentra altamente conservada en diferentes taxones bacterianos. Estructuralmente se encuentra formado por un complejo de tres proteínas: una proteína ubicada en la membrana interna **AcrB (3)**; otra ubicada en la membrana externa **TolC (1)**; y una proteína de fusión **AcrA (2)**. La energía necesaria para el funcionamiento de esta bomba es proporcionada por un gradiente de protones acoplado a la proteína de la membrana interna AcrB. Estas bombas son capaces de expulsar compuestos desde el citoplasma o el periplasma al exterior celular. Los sistemas Mex de *P. aeruginosa* pertenecen también a esta familia RND. Modificado de Blair y Piddock (2009).

La sobre-expresión de esta bomba produce un aumento de la resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, ácido nalidíxico y rifampicina (Okusu y cols., 1996). No obstante, su función

original podría estar dirigida a la resistencia de sales biliares en diferentes enterobacterias (Ma y cols., 1996; Perez y cols., 2012b). La expresión de AcrAB-TolC está modulada por la presencia de sales biliares y su activación es completamente necesaria para hacer frente a las condiciones del sistema gastrointestinal (Thanassi y cols., 1997). Lo mismo sucede con *Salmonella typhimurium* que para sortear la acción de las sales biliares y poder colonizar el intestino activa la expresión de este sistema de bombeo (Lacroix y cols., 1996).

### 1.3.1 Coste Metabólico de la sobre-expresión de los sistemas múltiples de expulsión de drogas

Se ha determinado que la sobre-expresión de los sistemas MDR puede afectar la eficacia biológica de los organismos, causando un gran impacto en su fisiología (Alonso y cols., 2004; Lertpiriyapong y cols., 2012; Linares y cols., 2005; Ruiz-Diez y cols., 2003), así como en la virulencia de organismos patógenos (Cosson y cols., 2002; Hirakata y cols., 2002; Lertpiriyapong y cols., 2012; Perez y cols., 2012b; Warner y cols., 2007).

Como se ha mencionado previamente, el funcionamiento de los sistemas MDR requiere un aporte energético constante. Cuando las bombas se sobre-expresan, el constante gasto de energía podría generar un coste metabólico, lo que podría conducir a la disminución o pérdida de la capacidad de crecimiento prácticamente en cualquier situación.

Pero no sólo el gasto de energía puede causar un coste en el *fitness*, la activación de reguladores globales que modulan la expresión de estos sistemas MDR pueden afectar el metabolismo de las bacterias. En *E. coli*, los reguladores globales MarA, RamA y SoxS pueden activar la expresión de AcrAB-TolC (Davin-Regli y cols., 2008). Además, inhiben de forma colateral la expresión de algunas porinas de la bacteria, lo que disminuye la obtención de nutrientes, ralentizando su crecimiento (Pages y cols., 2008).

Una de las características que puede verse afectada por la sobre-expresión de estas bombas es la virulencia. Muchos son los ejemplos en los que se ha demostrado que la activación de estos sistemas provoca una disminución de esta característica. La sobre-producción de MexEF-OprN causa una disminución de la expresión de los componentes del Sistema de Secreción Tipo III (SST3) en *P. aeruginosa* (Linares y cols., 2005; Tian y cols., 2009b). También se ha descrito que la sobre-expresión de la bomba CmeABC de *Campylobacter jejuni* se correlaciona con la disminución de la expresión de algunos elementos del Sistema de Secreción tipo VI (SST6) (Lertpiriyapong y cols., 2012). El funcionamiento de este sistema es fundamental para la colonización del intestino. Por otra parte, la activación del SST6 permite la entrada de bilis al interior de la célula lo que induce la expresión de la bomba, la que a su vez inhibe indirectamente la expresión de este sistema de secreción (Lin y cols., 2005).

## 1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo y no fermentativo perteneciente a la familia *Pseudomonaceae* (Holt y cols., 1994). Este organismo es una de las bacterias más versátiles desde el punto de vista metabólico, descrita hasta la fecha (Lister y cols., 2009). Este hecho le permite colonizar múltiples ambientes siendo aislada desde el agua de mar (Levin y Cabelli,



1972), el suelo (Green y cols., 1974), interaccionando en forma mutualista con raíces de plantas (Green y cols., 1974; Walker y cols., 2004) o bien como patógeno de plantas (Records, 2011; Walker y cols., 2004), animales (Petersen y cols., 2002) y humanos (Stover y cols., 2000). La capacidad de sobrevivir en cualquier ambiente con los requerimientos nutricionales mínimos (Favero y cols., 1971) y su baja sensibilidad a los antibióticos, lo han convertido en uno de los patógenos oportunistas nosocomiales más exitosos (Lister y cols., 2009), siendo el agente causal de un 17% de las infecciones intrahospitalarias en la década de los noventa en Europa (Couzigou y Joly, 2002).

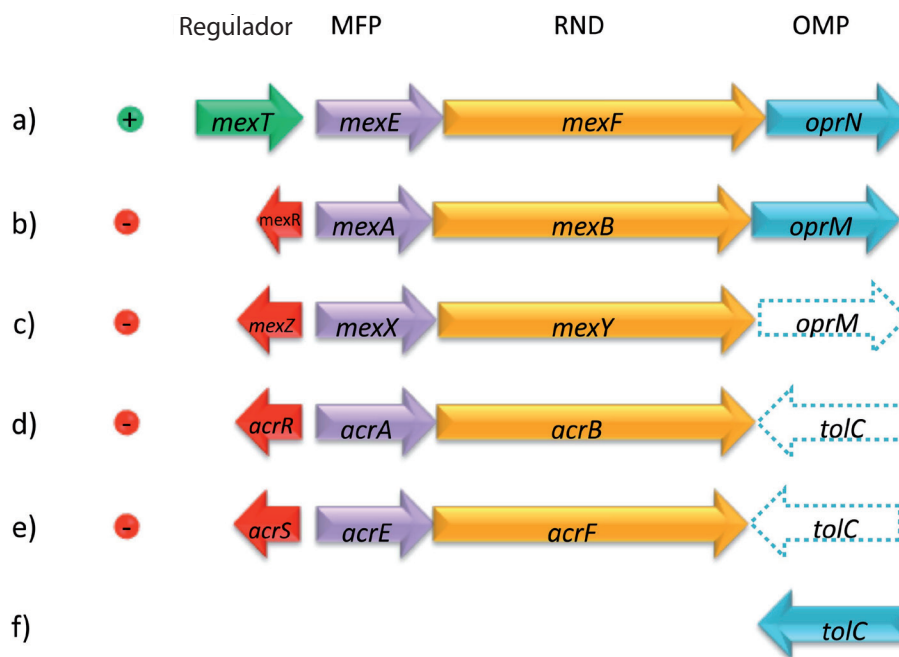
Actualmente, *P. aeruginosa* es considerada el patógeno oportunista más importante en Europa y el segundo en los Estados Unidos (Driscoll y cols., 2007; Navon-Venezia y cols., 2005). Es la principal causa de la enfermedad respiratoria nosocomial (Gaynes y Edwards, 2005) llegando a causar un 40-50% de mortalidad en pacientes intubados en unidades de cuidados intensivos (Rello y cols., 1996). Es también la tercera causa de enfermedades del tracto urinario (Lister y cols., 2009) y se ha relacionado con infecciones severas en individuos quemados, inmunosuprimidos y enfermos terminales de cáncer (Botzenhart y Döring, 1993). Asimismo, es considerada la causa principal de infección en el pulmón y mortalidad en individuos con fibrosis quística, la enfermedad hereditaria con mayor prevalencia en los individuos caucásicos (Ciofu y cols., 2012; Govan y Deretic, 1996; Grealley y cols., 2012).

No sólo la capacidad de sobrevivir en diversos ambientes es la causa del éxito ecológico de este microorganismo. Esta bacteria, también presenta altos niveles de resistencia a los antibióticos lo que muchas veces hace imposible su erradicación desde individuos infectados. Se considera que su capacidad de resistencia es muy variada y ha sido moldeada a lo largo de su historia evolutiva. Es por ello que se ha utilizado como organismo modelo para estudiar los mecanismos de resistencia a los antibióticos (Poole y cols., 1993).

Varios elementos contribuyen tanto a la resistencia intrínseca como adquirida de *P. aeruginosa*. La resistencia intrínseca de esta bacteria está dada fundamentalmente por las propiedades casi impermeables de la membrana celular (Nikaido, 1989), por la presencia de algunas enzimas inactivantes como AmpC (Stover y cols., 2000) y por la presencia de bombas de expulsión múltiple de drogas (Poole, 2001). Pero no sólo estos elementos contribuyen a la resistencia intrínseca, estudios realizados con librerías de mutantes generados por la inserción de transposones, han demostrado que una gran cantidad de genes contribuyen a la resistencia intrínseca a los antibióticos en esta bacteria (Alvarez-Ortega y cols., 2010; Fajardo y cols., 2008; Fernandez y cols., 2013).

#### 1.4.1 Sistemas de expulsión múltiple de drogas en *P. aeruginosa*

Hasta la fecha se han descrito 12 sistemas de bombeo tipo RND en *P. aeruginosa* (Poole, 2007; Schweizer, 2003; Stover y cols., 2000). MexAB-OprM; MexCD-OprJ; MexEF-OprN; MexXY; MexJK; MexGHI-OpmD; MexVW; TriABC-OpmH; CzcAB; YegMNO-OmpB; MexPQ-OpmB y MexMN. Todos ellos presentan la estructura típica de una bomba tipo RND y conservan la misma disposición en el genoma (Figura 1.4); con excepción de MexXY, MexJK y MexVW que utilizan como porina OprM codificada en el operón *mexAB-OprM*. De ellas sólo los mutantes que sobre-expresan MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY juegan un papel relevante en la resistencia a los antibióticos (Jeannot y cols., 2008; Poole, 2005).



**Figura 1.4. Disposición en el genoma y regulación transcripcional de los sistemas múltiples de bombeo pertenecientes a la familia RND.** Los reguladores de la expresión de las bombas de la familia RND pueden ser activadores transcripcionales, como MexT (a) o represores como MexR, MexZ, AcrR o AcrS (b, c, d y e). La disposición en el genoma puede ser de tres maneras: (i) Los tres elementos estructurales pueden estar codificados en el mismo operón, como es el caso de MexEF-OprN (a) o MexAB-OprM (b); (ii) La proteína de membrana interna y la proteína de fusión se encuentran en el mismo operón, pero utilizan una proteína de membrana externa de otro sistema, tal como MexXY (c) que usa OprM codificada en el operón de MexAB-OprM; ó (iii). La proteína de membrana externa puede estar codificada en cualquier lugar del cromosoma, como es el caso de TolC (f) que puede ser usada tanto por AcrAB (d) o AcrEF (e). Los sistemas MexAB-OprM, MexEF-OprN y MexXY están codificados en el genoma de *P. aeruginosa*, mientras que AcrAB y AcrEF están codificados en el de *E. coli*.

La regulación de estos sistemas de bombeo generalmente está mediada por un represor transcripcional ubicado inmediatamente delante el operón, que mantiene la expresión de las bombas a niveles casi imperceptibles. La activación del sistema se produce como consecuencia de una mutación en el gen codificante de dicho represor (Blair y Piddock, 2009) o bien por la interacción directa del represor con moléculas efectoras que liberan la represión (Hernandez y cols., 2009; Hernandez y cols., 2011).

Dentro de los sistemas MDR hasta ahora descritos sólo MexAB-OprM y MexXY participan activamente en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* (Buyck y cols., 2012; Li y cols., 2003a). MexAB-OprM está implicada en la resistencia a fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim, sulfonamidas, entre otros (Boutoille y cols., 2009; Poole y cols., 1993; Zhao y cols., 2009). También se ha mencionado que expulsa triclosán, solventes orgánicos, detergentes e inhibidores de la síntesis de ácidos grasos (Ghosh y cols., 2011; Li y cols., 2003a; Papadopoulos y cols., 2008; Poole, 2001; Robertson y cols., 2007; Starr y cols., 2012). Otra de las características importantes de MexAB-OprM es que puede expulsar elementos involucrados en *quorum sensing* como moléculas de homoserín lactona (C12-HSL) (Evans y cols., 1998; Pearson y cols., 1999) y otras moléculas relacionadas con este sistema (Kondo y cols., 2006; Minagawa y cols., 2012).

Respecto a MexCD-OprJ se ha descrito que puede expulsar quinolonas, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporinas de amplio espectro (Masuda y cols., 1996; Masuda y

cols., 1995; Masuda y cols., 2000b) ceftazidima y cefoperazona (Gotoh y cols., 1998). También está involucrada en la resistencia a algunos compuestos como el triclosán (Chuanchuen y cols., 2001) y a algunos desinfectantes como cloruro de benzalconio y gluconato de clorhexidina (Morita y cols., 2009).

Como se mencionó anteriormente MexXY está relacionado con la resistencia intrínseca, especialmente a aminoglicósidos, tetraciclina y eritromicina (Aires y cols., 1999; Masuda y cols., 2000a; Poonsuk y Chuanchuen, 2012). Aunque también se ha descrito que puede expulsar algunos  $\beta$ -lactámicos (Masuda y cols., 2000b). A diferencia de los sistemas descritos anteriormente, MexXY es el único que es inducido directamente por la presencia de antibióticos en el medio, especialmente por los aminoglicósidos (Hocquet y cols., 2003; Morita y cols., 2006).

La expresión de los sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY está reprimida en condiciones naturales debido a la actividad de sus reguladores específicos (Grkovic y cols., 2001). Esta regulación consiste en que el producto del gen represor, *mexR* para MexAB-OprM, *nfxB* para MexCD-OprJ y *mexZ* para MexXY, se une a la región promotora del gen impidiendo la transcripción tanto del operón como la suya propia (Matsuo y cols., 2004; Okazaki y Hirai, 1992; Sanchez y cols., 2002b). En el caso de MexAB-OprM, esta represión no es total ya que existe una expresión basal constante (Li y cols., 1995; Li y cols., 1998). Hasta la fecha, sólo se ha descrito que la mutación en estos represores provoca la sobre-expresión de los sistemas anteriormente mencionados.

El sistema MexJK está implicado en la resistencia a triclosán, eritromicina y tetraciclina pero el fenotipo sólo es visible en un mutante que carece de MexAB-OprM y MexCD-OprJ (Chuanchuen y cols., 2002). En esta bomba se ha descrito que la porina de la membrana externa podría ser un elemento clave en la selectividad del sustrato expulsado. De esta forma, el sistema utiliza la porina OpmH para la expulsión de triclosán mientras que para eritromicina y tetraciclina recurre a OprM (Chuanchuen y cols., 2005).

De igual forma, MexVW y MexMN necesitan de la porina OprM para funcionar. Entre los compuestos que expulsa MexVW se encuentran fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, bromuro de etidio y acriflavina (Li y cols., 2003b). Por otra parte, se ha descrito que MexMN expulsa cloranfenicol y tiamfenicol (Mima y cols., 2005).

En el caso del mutante que sobre-expresa MexPQ-OpmE se conoce que genera un aumento en la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas (Mima y cols., 2005), también se ha relacionado con procesos de desintoxicación en ambientes ricos en cobre (Thaden y cols., 2010).

Inicialmente se describió que MexGHI-OpmD, tenía la capacidad de expulsar vanadio, usado como basteriostático en los años 90's (Aendekerk y cols., 2002). Posteriormente, cuando se logró su sobre-expresión en un elemento extracromosomal se demostró que expulsa norfloxacin, bromuro de etidio, acriflavina y rodamina 6G (Sekiya y cols., 2003). Además, un estudio más reciente describió que esta bomba participa activamente en la expulsión de elementos de *quorum sensing* y en la desintoxicación de antranilato, molécula intermediaria en la síntesis de PQS -del inglés *Pseudomonas Quinolone Signal*- (Aendekerk y cols., 2005).

El resto de las bombas han sido muy poco estudiadas, sin embargo, se sabe que la sobre-expresión de TriABC-OpmH se relaciona con la resistencia a triclosán (Mima y cols., 2007); la de YegMNO-OmpB a la de colistina (Pamp y cols., 2008) y la de CzcAB a la expulsión de cadmio, zinc y cobre (Caille y cols., 2007; Dieppois y cols., 2012; Silver y Phung, 1996).

## 1.5 Bases moleculares de la sobre-expresión del sistema MexEF-OprN en *P. aeruginosa*

A diferencia de MexAB-OprM y MexCD-OprJ cuya expresión está regulada por un represor, MexEF-OprN está regulada positivamente por un activador transcripcional de la familia LysR (Kohler y cols., 1997) denominado MexT (Kohler y cols., 1999). La sobre-expresión de esta bomba confiere resistencia a quinolonas, cloranfenicol, trimetoprim e imipenem (Kohler y cols., 1997). No obstante, en el caso del imipenem, la resistencia se debe a una disminución en la expresión de la porina OprD, cuya expresión está regulada por MexT (Kohler y cols., 1999; Ochs y cols., 1999). Esta porina, además de ser la vía de ingreso de aminoácidos básicos al interior de la célula, es la principal ruta de entrada para este antibiótico (Trias y Nikaido, 1990a, b).

El regulador MexT se ubica inmediatamente delante del operón MexEF-OprN en el genoma de *P. aeruginosa* (Kohler y cols., 1999). Esta proteína interactúa con la región intergénica entre *mexT* y *mexE* uniéndose a secuencias de ADN que contienen; (i) una caja *nod* cuya secuencia característica es ATC-N9-GAT (Maseda y cols., 2010) y (ii) a la secuencia ATCA-N5-GTCGAT-N4-ACYAT (Tian y cols., 2009a). Recientemente se ha descrito una segunda caja *nod* en esta secuencia intergénica cuya posible función podría ser la unión de un represor hasta ahora no encontrado (Maseda y cols., 2010).

La no expresión de este sistema de bombeo en algunas cepas de *P. aeruginosa* se debe fundamentalmente a que en estas cepas el gen *mexT* contiene una inserción de 8 pb que genera una pérdida en el marco de lectura, lo que conlleva a que la proteína adquiera una configuración no funcional (Kohler y cols., 2001; Maseda y cols., 2000a). Se ha descrito que un 98% de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* que no expresan MexEF-OprN presentan esta inserción (Maseda y cols., 2000a). Por otra parte, también se han encontrado cepas con un MexT completamente funcional pero que no sobre-expresan MexEF-OprN o bien cepas que presentan un MexT inactivo pero que sobre-expresan esta bomba. La posible causa de estos fenotipos es que *mexS*, el gen ubicado inmediatamente delante de *mexT*, podría intervenir en la regulación de este sistema (Kumar y Schweizer, 2011; Sobel y cols., 2005).

La disminución de la expresión de OprD causada por la acción de MexT, indica que este activador puede regular la expresión de otras proteínas además de MexEF-OprN. Una de las primeras evidencias de la acción de MexT como regulador global, es la disminución de la expresión de los componentes del SST3 en un mutante que sobre-expresa MexEF-OprN (Linares y cols., 2005), mediante la regulación indirecta del activador del sistema *exsA* (Linares y cols., 2005; Tian y cols., 2009b).

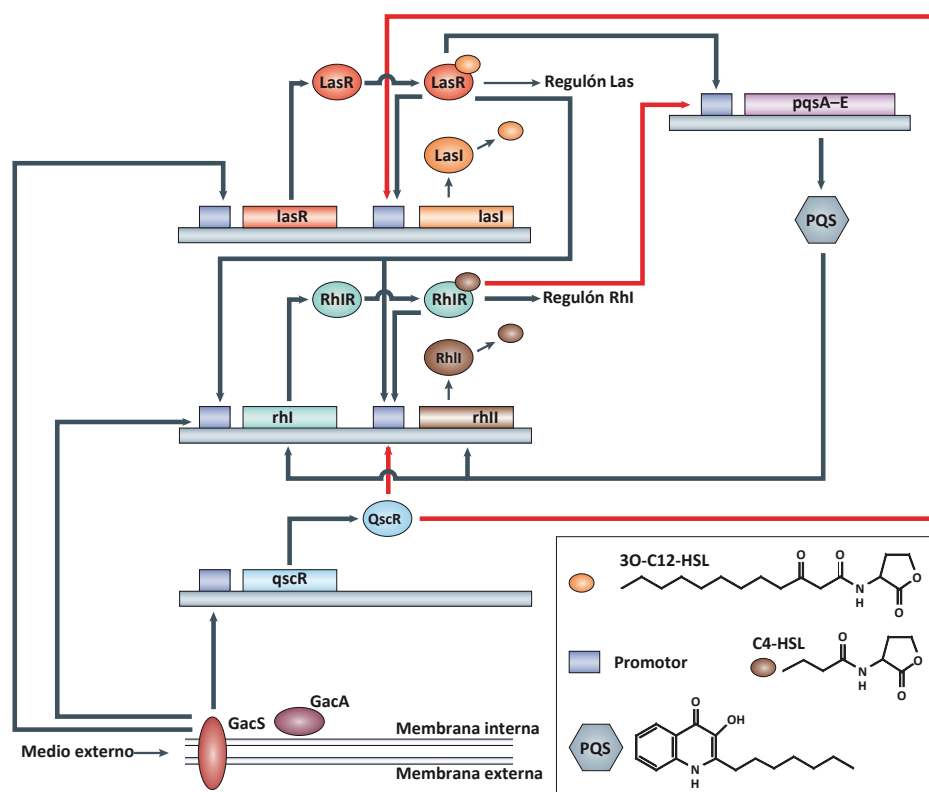
Un estudio reciente ha demostrado que un gran número de genes están regulados por MexT, este grupo de genes ha sido definido como el regulón de MexT (Jin y cols., 2011; Tian y cols., 2009a).

### 1.5.1 Coste biológico y metabólico asociado a la sobre-expresión de MexEF-OprN y otras bombas en *P. aeruginosa*

Una de las características de los sistemas MDR es su baja especificidad ya que son capaces de expulsar gran variedad de compuestos, incluso moléculas involucradas en *quorum sensing* (Kohler y cols., 2001; Pearson y cols., 1999). Trabajos anteriores han descrito que mutantes que sobre-expresan los sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN presentan una notable disminución en la expresión de factores de virulencia (sideróforos, elastasas, caseinasa, piocianina y ramnolípidos)

regulados por *quorum sensing* y son menos virulentos en el modelo de *Caenorhabditis elegans*, comparados con la cepa silvestre (154 Kohler y cols., 2001; Ruiz-Diez y cols., 2003; Sanchez y cols., 2002a; Sanchez y cols., 2002b).

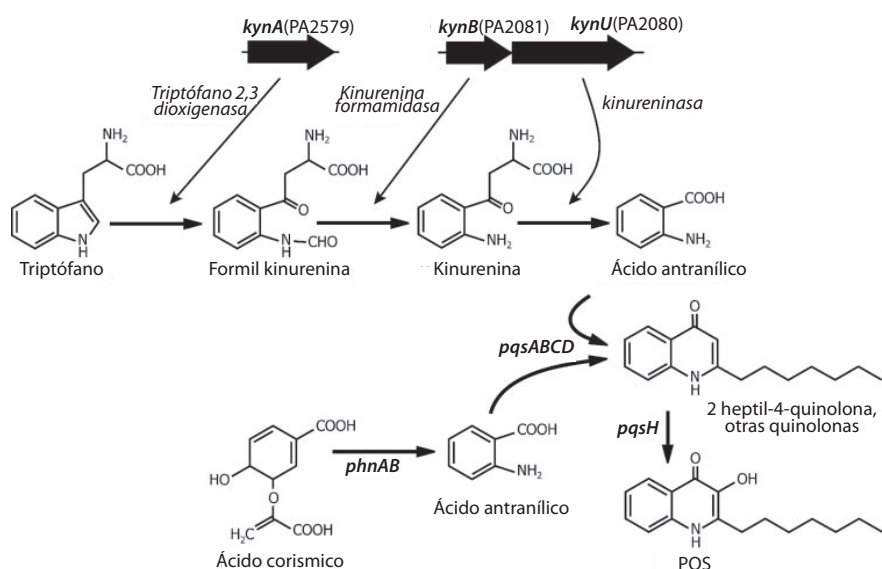
Gran parte de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* se encuentran regulados por *quorum sensing* (Whiteley y cols., 1999). *Quorum sensing* es un sistema dependiente de la densidad poblacional que se regula mediante la producción de moléculas autoinductoras y en condiciones de laboratorio se activa durante la fase estacionaria de cultivo (Swift y cols., 2001; von Bodman y cols., 2008; Williams, 2007; Williams y cols., 2007b; Withers y cols., 2001) (Figura 1.5). Los autoinductores de *quorum sensing* tienen como función regular la expresión de los genes dianas de este sistema. En *P. aeruginosa* existen dos tipos de moléculas señal (i) las homoserin-lactonas-N-acetiladas (acyl-HSL abreviatura por sus siglas en inglés) y (ii) las 4-quinolonas (4Q). Las homoserin-lactonas forman parte de los sistemas *las* y *rhl*. Estos sistemas están ampliamente distribuidos en diferentes taxones bacterianos, siendo el sistema LuxR-LuxI de *Vibrio fischeri* el que primero fue descrito. LuxI dirige la síntesis del precursor químico y LuxR actúa como regulador transcripcional de los genes diana (Eberhard, 1972; Fuqua y cols., 1996; Nealson y cols., 1970).



**Figura 1.5 Mecanismos de regulación del sistema de *quorum sensing*.** El sistema de quorum sensing de *P. aeruginosa* secreta dos autoinductores del tipo de la homoserin lactonas 30-C12-HSL y C4-HSL. Estas señales son reconocidas por los reguladores LasR y RhIR. Aparte de las homoserin lactonas *P. aeruginosa* secreta otra molécula autoinductora denominada PQS a partir del intermediario HHQ. PQS sale de la célula y regula la expresión de componentes del sistema RhlR. La relación jerárquica entre *las* y *rhl* depende de las condiciones de crecimiento y la función de ambos sistemas está regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional por los reguladores QscR, VqsR, el ribo-regulador RmsA y el factor sigma RpoS. Al aumentar la densidad celular, los autoinductores se acumulan hasta llegar a una concentración crítica, momento en el que se unirán a los reguladores transcripcionales LasR y RhIR, induciendo la transcripción de diversos genes en *P. aeruginosa*. Modificado de Lazdunski, y cols. (2004)

En *P. aeruginosa* LasI y RhlI, homólogos de LuxI de *Vibrio fischeri*, dirigen la síntesis de los precursores N-(3-oxododecanoyl)-homoserin-lactona ( $C_{12}$ -HSL) y N-butanoyl-L-homoserin-lactona ( $C_4$ -HSL) respectivamente. Estos productos se acumulan hasta llegar a una concentración crítica en la fase estacionaria de crecimiento, momento en el cual las moléculas  $C_{12}$ -HSL y  $C_4$ -HSL se unen a LasR y RhlR respectivamente, formando un complejo transcripcional que activa la expresión de genes diana (Pesci y cols., 1997; Winson y cols., 1995). Se ha descrito que el sistema LasR-LasI regula la expresión de factores de virulencia como la exotoxina A, exoproteasas y sideróforos (de Kievit y Iglewski, 2000; Gambello y Iglewski, 1991); mientras que el sistema RhlR-RhlI controla la producción de ramnolípidos, elastasas, piocinina, ácido cianhídrico, entre otros (Diggle y cols., 2002; Winson y cols., 1995). En este sistema de señalización existe una jerarquía ya que la vía *las* controla la vía *rhl* (Latifi y cols., 1996).

En lo que respecta a las 4-quinolonas, existen dos moléculas fundamentales, la 2-heptil-3-hidroxy-4-quinolona (PQS) y la 2-heptil-4-hidroxy-quinolona (HHQ) (Dubern y Diggle, 2008). PQS pertenece al grupo de compuestos llamados 4-alkil-quinolonas. La síntesis de las 4-alkil-quinolonas se produce por la condensación de la molécula de antranilato con un  $\beta$ -cetoácido (Cornforth y James, 1956). A su vez, el antranilato forma parte de la vía de degradación del triptófano (Calfee y cols., 2001). La transformación de antranilato hasta PQS es realizada fundamentalmente por un grupo de enzimas codificadas en el operón *pqsABCDE* cuyo producto principal es el intermediario HHQ (Gallagher y cols., 2002) (Figura 1.6). Esta molécula (HHQ) es transformada en PQS mediante la enzima PqsH y a su vez es también secretado al exterior de la célula (Deziel y cols., 2004).



**Figura 1.6. Vía de síntesis del antranilato.** El antranilato es una de las moléculas precursoras de la síntesis de PQS. La principal vía de síntesis de antranilato en medio LB es a partir de triptófano. La molécula de triptófano es transformada en formil-kinurenina por la enzima KynA codificada en el gen PA2579. En el siguiente paso la formil-kinurenina es transformada en kinurenina por la enzima KynB codificada en el gen PA2081. Finalmente la enzima KynU codificada en el gen PA2080 transforma la kinurenina en antranilato. Modificado de Farrow y Pesci (2007).

Los sistemas *las*, *rhl* y HHQ/PQS se encuentran altamente interconectados, prueba de ello es que la enzima PqsH es controlada por el sistema LasR-LasI (Gallagher y cols., 2002). De esta forma, cualquier cambio por mínimo que sea, podría afectar la cadena de reacciones que participan en la



señalización de *quorum sensing* (Williams y Camara, 2009).

En lo que respecta a la interacción entre los sistemas MDR y las moléculas de *quorum sensing* se ha descrito que MexAB-OprM y MexEF-OprN pueden expulsar la molécula inductora del sistema LasR-LasI, C<sub>12</sub>-HSL (Evans y cols., 1998; Kohler y cols., 2001; Pearson y cols., 1999). Esta sobre-expulsión de la molécula inductora, provocada por la sobre-expresión de los sistemas MDR mencionados, podría impedir su acumulación al interior de la célula evitando la activación del sistema de *quorum sensing*.

Por otra parte, la sobre-expresión de MexEF-OprN lleva asociada una disminución en la producción de componentes regulados por el sistema *rhl* (piocianina, elastasa, ramnolípidos, etc.) lo cual se ha relacionado con bajos niveles de PQS intracelular (Kohler y cols., 1997; Kohler y cols., 2001; Ramsey y Whiteley, 2004). Si bien para MexEF-OprN, se ha sugerido que la mayoría de las deficiencias en elementos regulados por *quorum sensing*, está mediada por una baja cantidad de PQS intracelular, no se ha demostrado si es realmente esta molécula o alguno de sus intermediarios el que está siendo expulsado.

## 1.6 Mecanismos de obtención de energía de *P. aeruginosa*

El éxito ecológico de *P. aeruginosa* se debe fundamentalmente a su gran capacidad para usar diferentes fuentes de carbono y obtener energía (Stanier y cols., 1966; Stover y cols., 2000). *P. aeruginosa* es capaz de generar energía mediante respiración aerobia, respiración anaerobia y también puede fermentar arginina, pero si hay oxígeno en el ambiente utiliza la vía aeróbica de forma preferente (Davies y cols., 1989; Eschbach y cols., 2004; Vander Wauven y cols., 1984; Zannoni, 1989). Uno de los efectos que podría tener la sobre-expresión de los sistemas MDR es alterar la homeostasis energética de *P. aeruginosa*.

### 1.6.1 Respiración aeróbica

La cadena respiratoria de oxígeno de *P. aeruginosa* está formada por al menos 17 deshidrogenasas, un número indeterminado de ubiquinonas y citocromos b y c y cinco oxidasas terminales (Williams y cols., 2007a). En lo que respecta a las deshidrogenasas, esta bacteria cuenta con tres NADH-deshidrogenasas, siendo la más importante la NADH-deshidrogenasa-traslocadora de protones, homóloga de la presente en la mitocondria (Williams y cols., 2007a). Otras deshidrogenasas importantes son la succinato-deshidrogenasa que cataliza la oxidación (2e<sup>-</sup>) de succinato a fumarato; una lactato deshidrogenasa y una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Lancaster, 2002; Lancaster y Simon, 2002).

En lo que respecta a las ubiquinonas, se han descrito 8 genes esenciales en *E. coli* de los cuales se han identificado 6 homólogos en *P. aeruginosa* (Stover y cols., 2000). Su función principal es la de transportar los electrones desde las deshidrogenasas hasta el complejo citocromo *bc1* o bien directamente a las quinol-oxidasas de la cadena respiratoria (Soballe y Poole, 19997).

El complejo citocromo *bc1* comprende una serie de proteínas transmembrana que catalizan la oxidación del ubiquinol (CQH<sub>2</sub>) y la reducción del citocromo c (Brandt y Trumpower, 1994; Crofts, 2004; Crofts y Berry, 1998; Trumpower, 1990, 1991). Este citocromo es el elemento más conservado del sistema ya que es fundamental tanto en la cadena respiratoria como en los fotosistemas, cuya función principal es la generación del potencial electroquímico necesario para la síntesis de ATP (Trumpower,

1990). En *P. aeruginosa* se ha descrito que este complejo permanece activo incluso en condiciones anaeróbicas (Hasegawa y cols., 2003; Ray y Williams, 1996).

Los principales componentes de la cadena respiratoria son las oxidasas terminales cuya función es la reducción de oxígeno con 4 electrones para la formación de una molécula de agua, evitando la formación de productos reducidos parcialmente como el anión superóxido  $O_2^-$  o el radical hidroxilo  $OH^\cdot$  (especies reactivas de oxígeno), nocivos para la célula (Williams y cols., 2007a). Sin embargo, la célula cuenta con múltiples mecanismos para evitar la formación de estas especies reactivas de oxígeno (van der Oost y cols., 1994).

Hasta ahora, se han descrito cinco oxidasas terminales en *P. aeruginosa* con diferentes afinidades por el oxígeno (Comolli y Donohue, 2002, 2004; Cooper y cols., 2003; Cunningham y cols., 1997; Cunningham y Williams, 1995; Fujiwara y cols., 1992; Matsushita y cols., 1982; Matsushita y cols., 1983; Stover y cols., 2000). De ellas dos pertenecen al grupo de las quinol oxidasas: la  $bo_3$  oxidasa (CYO) codificada en el operón *cyoABCDE* (PA1317-1321) y la oxidasa insensible a ácido cianhídrico (CIO) codificada en los genes *cioAB* (PA3929-3930). Las otras tres pertenecen a la familia de las citocromo c oxidasas (i) la oxidasa  $Cbb_3$ -1 codificada en el operón *ccoN1O1Q1P1* (PA1552-1554), (ii) la oxidasa  $Cbb_3$ -2 codificada en los genes *ccoN2O1Q2P2* (1555-1557), y (iii) la oxidasa  $aa_3$  ( $Aa_3$ ) codificada en los genes *coxBA-coll* (PA0105-0108). Cada una de ellas tiene una afinidad particular por el oxígeno y su expresión diferenciada le permite a la bacteria vivir en un amplio rango de condiciones ambientales (Kawakami y cols., 2010).

De todas ellas, CIO,  $Cbb_3$ -1 y  $Cbb_3$ -2 han sido descritas como oxidasas de alta afinidad y su expresión está fuertemente regulada por la concentración de oxígeno (Cooper y cols., 2003). Estas tres oxidasas mantienen el proceso respiratorio cuando la concentración de oxígeno baja del 2% y se ha visto que  $Cbb_3$ -1 y  $Cbb_3$ -2 son indispensables cuando la concentración de oxígeno baja de un 0,4% (Alvarez-Ortega y Harwood, 2007).

### 1.6.2 Mecanismos de generación de energía en condiciones anaeróbicas

En ausencia de oxígeno, *P. aeruginosa* puede crecer utilizando el nitrato como último aceptor de electrones. En este proceso de desnitrificación el nitrato o nitrito solubles son reducidos y liberados en forma de óxido nitroso ( $N_2O$ ) o nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) al ambiente (Zumft, 1997). El proceso es realizado por enzimas metalo-reductasas que secuencialmente van reduciendo los compuestos: nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa (Zumft, 1997) (Figura 1.7).



**Figura 1.7. Cadena respiratoria de nitrato.** En la cadena respiratoria de nitrato, los óxidos de nitrógeno ( $NO_3^-$  y  $NO_2^-$ ) son reducidos secuencialmente hasta  $N_2$ . En este proceso son producidos  $NO$  y  $N_2O$ . Cada paso es catalizado por una enzima diferente. La nitrato reductasa se encuentra ubicada en la membrana de la célula y activa un gradiente de protones a través de la membrana el que sirve para la síntesis de ATP a partir de ADP.

El primer paso del proceso de desnitrificación es la reducción de nitrato a nitrito. En *P. aeruginosa* se han descrito tres tipos de nitrato reductasas Nar, Nap y Nas, las cuales se encuentran



ubicadas en la membrana externa, en el periplasma y en el citoplasma, respectivamente (Berks y cols., 1995). Todas ellas presentan como componente activo una molécula de molibdeno (Arai, 2011). De las tres nitrato reductasas, sólo Nar participa en el proceso de desnitrificación bajo condiciones de anaerobiosis (Palmer y cols., 2007). Este sistema se encuentra codificado en el operón *narK1K2GHJ* (PA3872-3877). Las proteínas codificadas en el operón *nar*, NarK1 y NarK2 son las encargadas del transporte de nitrato/nitrito al interior de la célula, no obstante, la expresión de NarK2 es suficiente para que el proceso se lleve a cabo (Sharma y cols., 2006).

El paso siguiente es la reducción de nitrito a óxido nítrico catalizado por la enzima nitrato reductasa. Esta enzima está ubicada en el periplasma y la de *P. aeruginosa* pertenece al grupo de las citocromo *cd* nitrito reductasas (Zumft, 1997). Estas enzimas están formadas por dos subunidades idénticas, las que tienen un grupo hemo *c* y un hemo *d* para el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (Silvestrini y cols., 1994; Tegoni y cols., 1994). Esta enzima está codificada en el operón *nirSMCFDLGHJEN* (PA0509-0519) cuyo único gen estructural es *nirS* (Silvestrini y cols., 1989), mientras que los otros codifican los diferentes componentes de los citocromos (Arai y cols., 1990; Hasegawa y cols., 2001, 2003; Nordling y cols., 1990).

La reducción de NO a N<sub>2</sub>O es catalizada por una NO reductasa (Hendriks y cols., 2000; Zumft, 2005). Las NO reductasas bacterianas muestran muchas semejanzas con las familias hemo y cobre citocromo oxidasas y son consideradas los ancestros de los citocromos que participan en la respiración aeróbica (Busch y cols., 2002; Cramm y cols., 1999; Householder y cols., 2000). En *P. aeruginosa* la NO reductasa se encuentra codificada en el operón *norCBD*, donde *norC* y *norB* codifican los citocromos *c* y *b* respectivamente, mientras que *norD* codifica una subunidad soluble de la proteína (Zumft, 2005). Una característica muy importante de esta enzima es que no sólo participa en la cadena respiratoria de nitrato sino que también colabora en la desintoxicación de NO exógeno (Williams y cols., 2007a). Esta función es muy importante en la colonización de los pulmones ya que los macrófagos sintetizan óxido nítrico como mecanismo de defensa y la expresión de esta enzima es vital para sortear esta barrera (Kakishima y cols., 2007).

*Paeruginosa* presenta otra enzima encargada de la desintoxicación de NO; una flavohemoglobina codificada en el gen *fhp* (PA2664) (Arai y cols., 2005) que actúa como una dioxigenasa bajo condiciones aeróbicas y como NO reductasa en condiciones anaerobias (Poole y Hughes, 2000). Sin embargo, sólo en condiciones aeróbicas presenta funciones de desintoxicación (Arai y cols., 2005). Esta proteína es activada por el regulador transcripcional FhpR y no participa en la cadena de respiración de nitrato (Arai y cols., 2005).

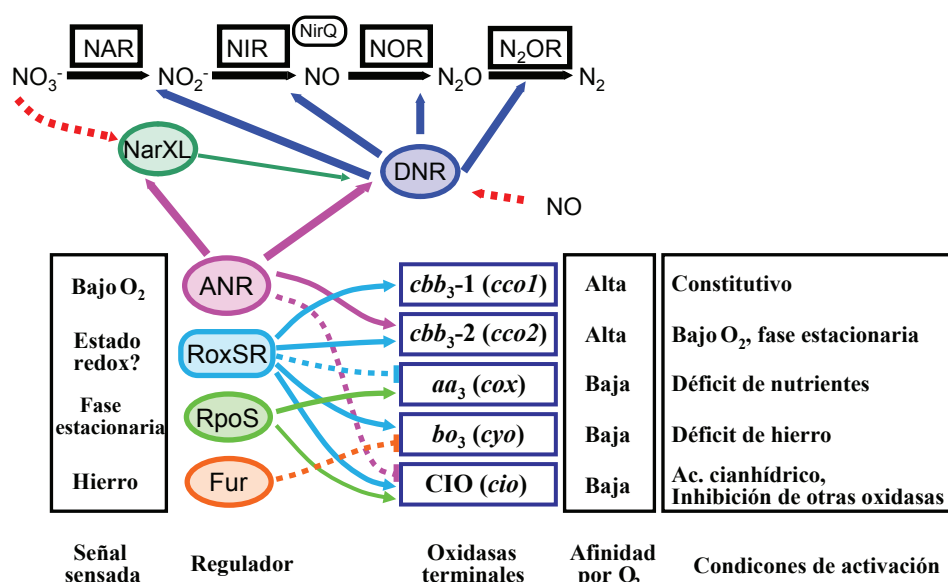
El último paso consiste en la reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>, catalizado por una N<sub>2</sub>O reductasa (SooHoo y Hollocher, 1990, 1991). Esta enzima se ubica en el periplasma y su centro activo está formado por una citocromo oxidasa de cobre (Zumft y Kroneck, 2007). En *P. aeruginosa* esta enzima está codificada en el operón *nosRZDFYL* (PA3391-3396), donde sólo *nosD* es estructural, en tanto *nosFY* están encargados de la inserción de cobre en la enzima (Arai y cols., 2003).

*P. aeruginosa* también puede crecer en ausencia de oxígeno y de nitrato, utilizando arginina como fuente de energía (Shoesmith y Sherris, 1960; Vander Wauven y cols., 1984). La fermentación de arginina a ornitina, mediada por la enzima arginina deimasa, produce 1 mol de ATP por molécula de arginina mediante fosforilación a nivel de sustrato. Esta enzima se encuentra codificada en el operón *arcDABC*, su expresión se activa ante la ausencia de oxígeno y es parcialmente reprimida ante

la presencia de nitrato (Benkert y cols., 2008; Gamper y cols., 1991; Luthi y cols., 1990).

### 1.6.3 Regulación de los mecanismos de obtención de energía

La regulación de los mecanismos de obtención de energía es muy compleja y depende de una serie de sensores y reguladores para cuya acción la concentración de oxígeno es fundamental. Tres son los reguladores más importantes: ANR, RoxSR y DNR. ANR participa en la regulación de los mecanismos anaerobios pero también regula la expresión de las oxidasas de alta afinidad *cbb<sub>3</sub>-1* y *cbb<sub>3</sub>-2* (Williams y cols., 2007a). Por otra parte, DNR es el activador transcripcional de la cadena respiratoria de nitrato mientras que RoxR regula la expresión de *cbb<sub>3</sub>-2* y CIO (Williams y cols., 2007a). ANR actúa como sensor directo de oxígeno y es el regulador global en condiciones anaeróbicas (Zimmermann y cols., 1991). Por otra parte RoxSR es un regulador transcripcional de dos componentes formado por un sensor quinasa presente en la membrana RoxS y el regulador RoxR (Figura 1.8)



**Figura 1.8. Esquema de la regulación de los mecanismos de obtención de energía de *P. aeruginosa*.** Diferentes activadores transcripcionales regulan la expresión de las oxidasas terminales de *P. aeruginosa*. Mientras RoxSR participa en la regulación de las cinco oxidasas terminales; ANR sólo regula directamente *cbb<sub>3</sub>-2* e indirectamente a *CIO*; RpoS regula directamente *aa<sub>3</sub>* y *CIO* finalmente Fur regula indirectamente *CIO*. La principal característica de las oxidasas terminales es su afinidad por el oxígeno, dato que se recoge en la figura. En condiciones anaerobias o de baja concentración de oxígeno, ANR (regulador principal), activa la expresión de DNR, a su vez DNR activa la expresión de todos los operones de la cadena respiratoria de nitrato en respuesta al aumento de la concentración de óxido nítrico. Un sistema de dos componentes que actúa como sensor de nitrato del medio *NarXL* es necesario para la activación del operón *nar* que codifica una nitrato reductasa, a su vez ANR y/o DNR pueden activar directamente la expresión del operón *nar*. *NirQ* podría regular el funcionamiento de la nitrito reductasa. Modificado de Arai (2011).

La expresión de los genes de la cadena respiratoria de nitrato es inducida por la baja concentración o ausencia total de oxígeno en presencia de nitrato o nitrito (Arai y cols., 1991a, b). Los reguladores ANR y DNR son necesarios para la total expresión de esta vía (Arai y cols., 1994, 1995; Arai y cols., 1997, 1999; Arai y cols., 2003; Schreiber y cols., 2007; Ye y cols., 1995). ANR actúa como sensor de oxígeno y regula la expresión de DNR, el cual activa directamente la cadena respiratoria de nitrato (Arai y cols., 1997). Además DNR actúa como sensor de  $\text{NO}$  y ante un aumento de concentración de

esta molécula, tóxica para la célula, ralentiza la expresión de componentes de esta cadena respiratoria (Arai y cols., 2003).

Teniendo en cuenta estos datos, la presente tesis doctoral se ha centrado en determinar los efectos de la sobre-expresión de sistemas MDR sobre la fisiología de *P. aeruginosa*. Como modelo hemos elegido al sistema MexEF-OprN, cuya activación depende de la expresión del alelo funcional del regulador transcripcional MexT. Estos cambios en la fisiología, podrían causar un coste en el *fitness* de *P. aeruginosa*, lo que representaría un reto metabólico para mantener la homeostasis del organismo. Con el fin de analizar estos cambios en la fisiología hemos abordado cinco puntos: (i) efectos sobre el *fitness* de la bacteria; (ii) efectos sobre el transcriptoma del organismo; (iii) efectos sobre los elementos de *quorum sensing*; (iv) efectos sobre la virulencia; y (v) efectos sobre el metabolismo de generación de energía. El estudio de estos temas nos ayudará a tener una visión global e integradora del efecto de la sobre-producción de un sistema MDR sobre la fisiología de *P. aeruginosa*.



## OBJETIVOS

---



## 2 Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es determinar el efecto de la sobre-expresión de las bombas de la familia RND sobre la fisiología de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Dentro de este contexto trataremos de analizar los siguientes aspectos:

Determinar el coste de *fitness* de la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN y cada uno de sus componentes mediante experimentos clásicos de determinación de velocidad de crecimiento y experimentos de competición con la cepa silvestre.

Identificar los genes de *P. aeruginosa* que están siendo regulados por MexT y diferenciarlos de aquellos cuya regulación depende exclusivamente del funcionamiento de la bomba MexEF-OprN.

Determinar el sustrato natural de MexEF-OprN.

Analizar elementos comunes que pueden afectar el *fitness* de mutantes que sobre-expresan sistemas de bombeo múltiple de drogas.





## MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Cepas Bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en el presente trabajo se describen en las tablas 3.1 y 3.2.

#### 3.2 Medios y condiciones de cultivo

Tanto las cepas de *E. coli* como las de *P. aeruginosa* fueron cultivadas de forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB) (Pronadisa) a 37°C con agitación constante de 250 rpm.

A menos que se indique lo contrario, las estirpes de *P. aeruginosa* fueron cultivadas en matraces de 100 ml que contenían 25 ml de medio LB, a 37°C y una agitación constante de 250 rpm.

En los experimentos para determinar el tiempo de duplicación en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono (10 mM de succinato, 10 mM de citrato y 20 mM de piruvato), se utilizó el medio M63 (US Biological) suplementado con 1 mM de  $MgSO_4$ .

Para determinar la velocidad de crecimiento utilizando los intermediarios de la síntesis de PQS como única fuente de carbono, las cepas de *P. aeruginosa* fueron cultivadas en medio M63 (US Biological) suplementado con 1mM de  $MgSO_4$ , conteniendo 10 mM de antranilato (Sigma, Aldrich), 10 mM de L-triptófano (Sigma, Aldrich) ó 10 mM de L-kinurenina (Sigma, Aldrich), de manera independiente, en cada caso. Estos medios fueron esterilizados mediante filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu m$ .

El medio sintético de esputo de enfermo de fibrosis quística (SCFM) se preparó como lo describe previamente Palmer, y cols. (2007).

Los tiempos de duplicación se determinaron por duplicado y el experimento fue repetido en tres días diferentes (un total de seis datos).

Los experimentos de sensibilidad a compuestos donadores de óxido nítrico se hicieron en medio LB con 5 mM y 15 mM de Nitroprusiato de Sodio (SNP) (Sigma, Aldrich), mientras que el S-Nitroglutation (GSNO) (Sigma, Aldrich) fue utilizado a una concentración final de 10 mM.

Para los ensayos de determinación de la CMI mediante EpsilonTest® (AB Biodisk) se utilizó agar Müller Hinton (29) y se siguió el procedimiento indicado por el fabricante.

En el caso de la inducción del SST3 se utilizó medio LB conteniendo 5 mM de EGTA y 20 mM de  $MgCl_2$  (Dacheux y cols., 2001).

Para el ensayo de virulencia en *C. elegans* las cepas de *P. aeruginosa* se cultivaron en medio infusión cerebro corazón (BHI) (Oxoid).

Con el fin de seleccionar el mutante de delección en *nirS* se utilizó medio PIA (*Pseudomonas Isolation Agar*) (Fluka) suplementado con glicerol, al cual se le añadió antibióticos o sacarosa según se describe en el apartado 3.8.2.

#### 3.3 Determinación del coste biológico (*Fitness*)

El coste biológico (*fitness*) fue determinado mediante experimentos de competición entre los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN de *P. aeruginosa* y la respectiva cepa silvestre.

CEPAS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA/ORIGEN
<b><i>E. coli</i></b>		
TG1	Cepa huésped para transformaciones utilizada en clonaje. K-12 <i>supE44 thi-1 Δ(lac<sup>-</sup> pro AB) Δ(mcrB<sup>-</sup> hsdSM)5, (rK<sup>-</sup> mK<sup>-</sup>)</i>	Colección laboratorio (Sambrook and Russell, 2001)
XL1-Blue	Cepa huésped para transformaciones utilizada en clonaje. <i>supE hsdR lac<sup>-</sup> F' pro AB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZAM15</i>	Colección laboratorio (Sambrook and Russell, 2001)
DH5α	Cepa huésped para transformaciones utilizada en clonaje. <i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZ ΔM15) hsdR 17 recA 1 endA 1 gyrA 96 thi-1 relA 1</i>	Colección laboratorio (Sambrook and Russell, 2001)
One Shot OmniMax™ 2 T1 Phage-resistance Cells	Cepa huésped para transformaciones utilizada en clonaje. F' {proAB, lacI <sup>q</sup> , lacZDM15, Tn10(TetR), D(ccdAB), mcrA, D(mrr, hsdRMS <sup>-</sup> mcrBC), F80(lacZ)DM15, D(lacZYA-argF)U169, endA1, recA 1, supE44, thi-1, gyrA 96, relA 1, tonA, panD	Invitrogen
S17	recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Colección laboratorio (Simon et al, 1983)
OP50	Cepa utilizada como alimento rutinario para <i>C. elegans</i> . Cepa auxótrofa para uracilo derivada de la estirpe <i>E. coli</i> B	Colección laboratorio (Brenner, 1974)
K12	Cepa silvestre de <i>E. coli</i> utilizada para obtener mutante que sobre-expresa AcrAB-TolC. F'proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15 zff::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	Colección laboratorio (Blattner et al, 1997)
JO0305	Mutante espontáneo obtenido a partir de la cepa K12 que sobre-expresa AcrAB-TolC	Este estudio
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
PT5	Cepa silvestre PAO1, almacenada en Ginebra.	Colección laboratorio T. Köhler (Köhler et al, 1997)
PT149	PT5nfxC; sobre-expresión de MexEF-OprN	Colección laboratorio T. Köhler (Köhler et al, 1997)
PT364	PT5 oprD::ΩTc; no produce la porina OprD2	Colección laboratorio T. Köhler (Epp et al, 2001)
PT637	PT149mexE::ΩHg, no produce la bomba MexEF-OprN.	Colección laboratorio T. Köhler (Köhler et al, 2001)
PAO1 pqsA CTX-lux H pqsA	Cepa mutante de pqsA, que contiene una copia del promotor de este gen ligado al operón luxCDABE inserto en una zona neutral del cromosoma	Colección laboratorio P. Williams (Fletcher et al, 2007)
PT149 (pUCP24)	PT149 que contiene el plásmido pUCP24	Este estudio
PT149 (pUCKynA)	PT149 que sobre-expresa kynA a partir del plásmido pUCP24	Este estudio
PT149 (pUCKynB)	PT149 que sobre-expresa kynA a partir del plásmido pUCP24	Este estudio
PT5 ΔnirS	PT5ΔnirS. Cepa con la cadena respiratoria de nitrato inactiva	Este estudio
PT149 ΔnirS	PT149ΔnirS. Cepa con la cadena respiratoria de nitrato inactiva	Este estudio
PAO1-V	Cepa silvestre PAO1 de origen clínico, conservada en Madrid	Colección laboratorio
PAO1-L	Cepa PAO1 conservada en Marsella	Colección laboratorio
MexAB-OprN	Mutante espontáneo obtenido a partir de la cepa PAO1-V que sobre-expresa el sistema MexAB-OprN	Colección laboratorio (Linares, 2005)
MexCD-OprJ	Mutante espontáneo obtenido a partir de la cepa PAO1-V que sobre-expresa el sistema MexCD-OprJ	Colección laboratorio (Linares, 2005)
MexXY	Mutante espontáneo obtenido a partir de la cepa PAO1-V que sobre-expresa el sistema MexXY	Colección laboratorio (Linares, 2005)
<b><i>C. elegans</i></b>		
Bristol N2	Cepa utilizada en los experimentos de virulencia	Colección laboratorio A. Navas (Brenner, 1974)

**Tabla 3.1.** Cepas bacterianas y organismos utilizados en este trabajo

Plásmidos	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA/ORIGEN
pGemT-Easy	Amp <sup>R</sup> vector comercial para clonar productos de PCR	Promega
pGemkynA	Plásmido derivado de pGem-T easy que lleva el gen <i>kynA</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este estudio
pGemKynB	Plásmido derivado de pGem-T easy que lleva el gen <i>kynB</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este estudio
pGemnirS	Plásmido derivado de pGem-T easy que lleva el gen <i>nirS</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este estudio
pUCP24	Plásmido derivado de pUCP18 donde se sustituye un fragmento <i>Sca I-Stu I</i> de 1352 pb con el fragmento de 832 pb que contiene el gen que codifica para Gm <sup>R</sup> . Procedente del vector pUCGM	Colección laboratorio (West et al, 1994)
pUCkynA	Plásmido derivado de pUCP24 que lleva el gen <i>kynA</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este estudio
pUCkynB	Plásmido derivado de pUCP24 que lleva el gen <i>kynB</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este estudio
pX18Ap	Ap <sup>R</sup> . Plásmido utilizado para recombinación en <i>P. aeruginosa</i>	Colección laboratorio (Hoang et al, 1998)
pNIRS3	Plásmido derivado de pX18Ap que lleva el gen <i>nirS</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este estudio

**Tabla 3.2.** Plásmidos y construcciones empleadas en este trabajo

Cada cepa se cultivó de forma individual durante 18 horas. Al día siguiente, se mezclaron volúmenes iguales de la cepa silvestre y del mutante, las cuales fueron diluidas 1:1000 en matraces que contenían 25 ml de LB sin antibióticos. Este cultivo mixto se creció a 37°C con agitación constante de 250 rpm. Cada 24 horas, 25 µl del cultivo mixto fueron inoculados en 25 ml de medio LB. Para determinar las células viables, cada día se realizaron diluciones seriadas del cultivo mixto 1:10 en solución salina; las diluciones 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> se sembraron por duplicado en LB agar libre de antibióticos con el fin de contar el número total de colonias. En paralelo, estas mismas diluciones fueron sembradas en placas que contienen 15 µg/ml de cloranfenicol para seleccionar PT149 y 3,5 µg/ml de imipenem para seleccionar PT364 y PT637, concentraciones a las cuales no puede crecer la cepa silvestre.

El número de células susceptibles se calculó como el número total de células bacterianas, menos el número de células resistentes a los antibióticos y los resultados se expresaron como porcentaje de células resistentes al fármaco con respecto a la cepa silvestre. Se realizaron tres experimentos, cada uno de ellos por triplicado (Un total de 9 datos). El cálculo del *fitness* relativo se realizó como lo describe Sander, y cols. (2002).

### 3.4 Producción de elementos de virulencia

#### 3.4.1 Producción de Piocianina

Las diferentes estirpes de *P. aeruginosa* se crecieron durante 48 horas en matraces de 100 ml que contenían 25 ml de medio AAC (Atlas 1993). A continuación los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 8000 x g, dos veces sucesivas. Los sobrenadantes fueron recuperados y se midió la densidad óptica a 690 nm (Cox, 1986).

### **3.4.2 Producción de Proteasas**

#### **3.4.2.1 Caseinasa**

Las bacterias se crecieron en medio LB a 37°C hasta que alcanzaron una  $DO_{600}$  de 2,0. Estos cultivos fueron centrifugados durante 10 minutos a 9000 x *g* dos veces sucesivas. Una alícuota de 100 µl de los sobrenadantes fue mezclada con 100 µl de azocaseína (5 mg/ml en 100 mM de Tris-HCl pH 8,0) durante una hora a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 400 µl de ácido tricloroacético al 10% para detener la reacción y se incubó cada muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó la mezcla a 14000 x *g* durante 10 minutos y el sobrenadante fue neutralizado con 700 µl de NaOH 525 mM. Finalmente se midió la densidad óptica a 442 nm (Benitez y cols., 2001).

#### **3.4.2.2 Elastasa**

Las bacterias se crecieron durante 18 horas y se centrifugaron como se ha descrito en el apartado anterior. Se mezclaron 100 µl del sobrenadante con 1 ml de solución de Rojo Congo (10 mg/ml en 0,1 M Tris-HCL pH 7,4). Esta mezcla fue incubada a 37°C durante 6 horas en agitación constante a 250 rpm. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 6000 x *g* y se midió la densidad óptica del sobrenadante a 495 nm (Rust y cols., 1994).

#### **3.4.3 Producción de Hemolisina**

El ensayo se realizó como lo describe Gomez-Gomez, y cols. (1996). Las células fueron crecidas en medio LB hasta fase estacionaria temprana ( $DO_{600}$  2,0). Se tomaron 100 µl de cultivo y se mezclaron con 900 µl de PBS que contiene 2,5% (v/v) de sangre de caballo (Oxoid). La muestra fue incubada por una hora a 37°C sin agitación y posteriormente se centrifugó a 6000 x *g* durante 10 minutos. La actividad hemolítica de los sobrenadantes se evaluó midiendo la densidad óptica a 545 nm. El 100% de la hemólisis se logró por choque hipotónico con agua destilada.

### **3.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de SNP y GSNO**

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de SNP y GSNO se determinaron por el método de microdilución en medio Müller-Hinton según las recomendaciones del "Clinical and laboratory standards Institute" CLSI (1997). Brevemente, se realizaron diluciones seriadas 1:2 de cada uno de los compuestos en placas de 96 pocillos. La CMI se determinó como aquella concentración más baja de SNP y GSNO que inhibe el crecimiento visible de la bacteria después de una incubación a 37°C durante 18 horas. Los experimentos se realizaron en el lector de microplacas Infinite200 (Tecan).

### **3.6 Técnicas de ADN**

#### **3.6.1 Técnicas generales**

La extracción de ADN genómico fue realizada con el kit comercial "Genome DNA Kit" (Q-BIOgene) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN plasmídico fue extraído utilizando el sistema de purificación comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

La purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa se realizó con el "Gel Band

purification kit” (GE Healthcare), mientras que para la purificación de fragmentos a partir de una reacción de PCR se usó el sistema “QIAquick PCR purification Kit” (QIAGEN).

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron con los tampones y las indicaciones de la casa comercial correspondiente.

En el caso de las ligaciones se utilizó la enzima T4 DNA ligase (New England BioLabs) y la reacción se incubó por 18 horas a 16°C.

Las electroforesis en geles de agarosa se hicieron siguiendo los protocolos establecidos previamente por Sambrook y Russell (2001).

### 3.6.2 Reacción de PCR

Los cebadores utilizados en esta tesis se detallan en la tabla 3.3.

Las amplificaciones rutinarias por PCR fueron realizadas con el sistema PCR master mix (Promega). Los cebadores se utilizaron a una concentración final de 0,625  $\mu$ M y se utilizó entre 100 y 500 ng de ADN molde. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 10 min a 94°C; 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 30 segundos a 55-60°C (dependiendo de la temperatura de fusión de los cebadores) y de 30 segundos a 3 minutos a 72°C (en función de la longitud del fragmento que se desee amplificar). Para finalizar, se realizó una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del Parque Científico de Madrid.

## 3.7 Técnicas de ARN

### 3.7.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó según Schuster, y cols. (2003). 10 ml del cultivo total fueron centrifugados a 7200 x *g* durante 20 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 570  $\mu$ l de TE. A continuación se adicionaron 20  $\mu$ l de lisozima (20 mg/ml) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos siendo agitada de forma intermitente con un vórtex. A continuación, se agregaron 2100  $\mu$ l de tampón RLT y la muestra fue sometida a ultrasonido en dos ciclos de 30 segundos (frecuencia constante, 0,45 Hz de potencia). Posteriormente se agregaron 1410  $\mu$ l de etanol 100% (Merck), se mezcló y se continuó con el protocolo del sistema de extracción RNeasy mini Kit (QIAGEN).

Para eliminar la contaminación por ADN se realizó un primer tratamiento con DNasa de la muestra en la columna de RNeasy, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se procedió a realizar una segunda digestión utilizando el sistema TURBO DNase (Ambion). Las muestras fueron filtradas nuevamente a través de una columna de RNeasy para eliminar cualquier traza de DNasa (Protocolo de “Clean Up”).

Para verificar que la muestra de ARN no estuviese contaminada con ADN, se realizó una PCR utilizando los cebadores que amplifican el gen *rplU* para *P. aeruginosa* y *gapA* para *E. coli* (Tabla 3.3). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: Desnaturalización inicial 10 minutos a 94°C; 30 ciclos de 94°C por un minuto, 1 minuto a 58°C y 72°C por un minuto. Extensión final a 72°C durante 10 minutos. En caso de que las muestras presentaran contaminación con ADN, eran tratadas nuevamente con el sistema TURBO DNase (Ambion) con el consiguiente “Clean Up”

Cebador	Secuencia	Descripción de uso	T°
KynAF <sub>EcoRI</sub>	5'-CGCCCGAATTCATGTGTCTTGCCCTCACTC-3'	Amplificación del gen <i>kynA</i> para clonarlo en pUCP24	62°C
KynAR <sub>HindII</sub>	5'-CGCCCAAGCTTTTCCGCGAAGAAGGCTTG-3'	Amplificación del gen <i>kynA</i> para clonarlo en pUCP24	62°C
kynBF <sub>EcoRI</sub>	5'-CGCCCGAATTCATGACTTCGCTCCGCTACTG-3'	Amplificación del gen <i>kynB</i> para clonarlo en pUCP24	62°C
kynBR <sub>BamHI</sub>	5'-CGCCCGGATCCTCACGAGTGGTCATCGGTTA-3'	Amplificación del gen <i>kynB</i> para clonarlo en pUCP24	62°C
mexT F	5'-CGTGTTGAGACCTGATG-3'	Diferenciación de los alelos del gen <i>mexT</i>	60°C
mexT R	5'-GACAGGTGGGCGAAGATTT-3'	Diferenciación de los alelos del gen <i>mexT</i>	60°C
mexTSPF	5'-GTTCTCGGCCAGCCGGCCAGCC-3'	Diferenciación de los alelos del gen <i>mexT</i>	60°C
nirSF <sub>up</sub>	5'-CCCAAGCTTTCTCGGCCATCCGCCGATAGG-3'	Construcción del mutante de delección en el gen <i>nirS</i> .	67°C
nirSR <sub>up</sub>	5'-TAGACCATGCCATTTGGCACGCGGGTCTCAGTACAC-3'	Construcción del mutante de delección en el gen <i>nirS</i> .	74°C
nirSF <sub>dow</sub>	5'-GTGTACTGAGACCCGCGTGCCAAATGGCATGGTCTA-3'	Construcción del mutante de delección en el gen <i>nirS</i> .	76°C
nirSR <sub>dow</sub>	5'-CCCAAGCTTGTCAGGGCCAGGAACAGCAGG-3'	Construcción del mutante de delección en el gen <i>nirS</i> .	73°C
rplU F	5'-CGCAGTGATTGTTACCGGTG-3'	Verificación contaminación con ADN	60°C
rplU R	5'-AGGCCTGAATGCCGGTGATC-3'	Verificación contaminación con ADN	60°C
M13 F	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'	Secuenciación pGemT-Easy	55°C
M13 R	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'	Secuenciación pGemT-Easy	55°C
Cebadores RT-PCR en tiempo real			
Cebadores	Secuencia	Gen amplificado	T°
acrB F	5'-CCATCAAGTCTTTGGCGAAT-3'	<i>acrB</i>	58°C
acrB R	5'-GTCGATTCGGTCTCCGTTA-3'	<i>acrB</i>	58°C
anr F	5'-TGAAGAAAGGCGAATTCCTG-3'	<i>anr</i>	58°C
anr R	5'-CGGATAGGTCTCGGTATCCA-3'	<i>anr</i>	58°C
arcA F	5'-AGTACCTGGGCCATTCCAG-3'	<i>arcA</i>	58°C
arcA R	5'-CTCGGGGTGGAACCTTGTA-3'	<i>arcA</i>	58°C
arcB F	5'-CAACATGCACAACCGTAACC-3'	<i>arcB</i>	58°C
arcB R	5'-GTGCGAGTGGAGGTTTTCTC-3'	<i>arcB</i>	58°C
ccoN2 F	5'-TCTACCACCTGATCCCGAAG-3'	<i>ccoN2</i>	58°C
ccoN2 R	5'-CGACGAAGGAGTAGGTCAGG-3'	<i>ccoN2</i>	58°C
cioA F	5'-TGTCGGATTGGAGGCTATC-3'	<i>cioA</i>	58°C
cioA R	5'-CGGTAGACCTCTTCGTTCTG-3'	<i>cioA</i>	58°C
cioB F	5'-GCTCACCTGGTGTGATCT-3'	<i>cioB</i>	58°C
cioB R	5'-CGAGGATGAAGGGAATGATG-3'	<i>cioB</i>	58°C
clpV1 F	5'-TCAACATGAGCAGTTCCA-3'	<i>clpV1</i>	58°C
clpV1 R	5'-GCCTTCTCCACTTCATCCAG-3'	<i>clpV1</i>	58°C
cyoA F	5'-AGAAGGCGTATTCGACGGTA-3'	<i>cyoA</i>	58°C
cyoA R	5'-GCTTGACCAGTTCGGATAG-3'	<i>cyoA</i>	58°C
cyoB F	5'-CCTCAACTCGCTGAGCTTCT-3'	<i>cyoB</i>	58°C



Cebadores RT-PCR en tiempo real			
Cebadores	Secuencia	Gen amplificado	T°
cyoB R	5'-GCGCCCAGATGTAGTAGTCC-3'	<i>cyoB</i>	58°C
dnr F	5'-GACGAGATCGAGACGCTTTC-3'	<i>dnr</i>	58°C
dnr R	5'-CATGATTCCGCGAGAAGGTTT-3'	<i>dnr</i>	58°C
exoS F	5'-AGAGAGCGAGGTGAGCAGAG-3'	<i>exoS</i>	58°C
exoS R	5'-ATGCCGGTGTAGAGACCAAG-3'	<i>exoS</i>	58°C
exsA F	5'-TCAAGGGGTTGAAGGAATTG-3'	<i>exsA</i>	58°C
exsA R	5'-TCCATGAATAGCTGCAGACG-3'	<i>exsA</i>	58°C
fhp F	5'-ATTCTACCGCACCATGCTC-3'	<i>fhp</i>	58°C
fhp R	5'-AGTTCCTGCAACTGGTCGAT-3'	<i>fhp</i>	58°C
fnr F	5'-TGATCCTGCTGTTGTCGAAG-3'	<i>fnr</i>	58°C
fnr R	5'-TCAGGCCAGATAGTTACCG-3'	<i>fnr</i>	58°C
gapA F	5'-GCTAACCTGAAATGGGACGA-3'	<i>gapA</i>	58°C
gapA R	5'-TTGTCGAAGTTAGCGCCTTT-3'	<i>gapA</i>	58°C
hcnA F	5'-CATGACCATCCACCTCAATG-3'	<i>hcnA</i>	58°C
hcnA R	5'-GGTTGCTTTCGGTTTCCAC-3'	<i>hcnA</i>	58°C
hcnB F	5'-ATCTCAAGCTCAACGGCATT-3'	<i>hcnB</i>	58°C
hcnB R	5'-GTATCCGTCGCTCGTGAAG-3'	<i>hcnB</i>	58°C
hcp1 F	5'-GGACCTGTCGTTACCAAGT-3'	<i>hcp1</i>	58°C
hcp1 R	5'-GGACACCAGGACTTCCTTCA-3'	<i>hcp1</i>	58°C
hcp2 F	5'-GGCTTCAACCACGAAGTGAT-3'	<i>hcp2</i>	58°C
hcp2 R	5'-TGCGGTACCACTGGATCTC-3'	<i>hcp2</i>	58°C
hcp3 F	5'-CCTCACCAAGTTCATCGACA-3'	<i>hcp3</i>	58°C
hcp3 R	5'-GAGAGCACCACTGTTGTTTCA-3'	<i>hcp3</i>	58°C
hmp F	5'-TCCCTTTACTGGTGAAACG-3'	<i>hmp</i>	58°C
hmp R	5'-ACTGTTCCGGTTTGATCTGG-3'	<i>hmp</i>	58°C
lasA F	5'-ATGGACCAGATCCAGGTGAG-3'	<i>lasA</i>	58°C
lasA R	5'-CGTTGTCGTAGTTGCTGGTG-3'	<i>lasA</i>	58°C
lasB F	5'-ATCGGCAAGTACACCTACGG-3'	<i>lasB</i>	58°C
lasB R	5'-ACCAGTCCCGGTACAGTTTG-3'	<i>lasB</i>	58°C
lasR F	5'-AAGGACAGCCAGGACTACGA-3'	<i>lasR</i>	58°C
lasR R	5'-GTAGATGGACGGTTCACAGA-3'	<i>lasR</i>	58°C
mexA F	5'-GCAGACGGTGACCCTGAATA-3'	<i>mexA</i>	58°C
mexA R	5'-GGGTCGATCTGGTAGAGCTG-3'	<i>mexA</i>	58°C
mexC F	5'-GACCTGCTGTTCCAGATCG-3'	<i>mexC</i>	58°C
mexC R	5'-GTGGCGGTATCGAAGTCCT-3'	<i>mexC</i>	58°C
mexG F	5'-GGCGAAGCTGTTGACTATC-3'	<i>mexG</i>	58°C
mexG R	5'-AGAAGGTGTGGACGATGAGG-3'	<i>mexG</i>	58°C
mexH F	5'-CGGTCACCTATACCGCCTAC-3'	<i>mexH</i>	58°C
mexH R	5'-TCAGGGTGCTCTTCTTGACC-3'	<i>mexH</i>	58°C
mexX F	5'-GTACGAGGAAGGCCAGGAC-3'	<i>mexX</i>	58°C
mexX R	5'-CTTGATCAGGTCGGCGTAG-3'	<i>mexX</i>	58°C
narG F	5'-GGAGATCACCTGAACTGGA-3'	<i>narG</i>	58°C
narG R	5'-CACCTCGACCCAGTCGTTAT-3'	<i>narG</i>	58°C
nfrC F	5'-AATGCGATTTCTGCCGTAAG-3'	<i>nfrC</i>	58°C

Cebadores RT-PCR en tiempo real			
Cebadores	Secuencia	Gen amplificado	T°
nfrC R	5'-TGTAGCGGTAAGTGGGCTTC-3'	<i>nfrC</i>	58°C
nirQ F	5'-GCGGTATCTGCTACCTGGAC-3'	<i>nirQ</i>	58°C
nirQ R	5'-TAGGACACCACCAGCATGAA-3'	<i>nirQ</i>	58°C
nirS F	5'-GCCAACAACTCCAACAAGGT-3'	<i>nirS</i>	58°C
nirS R	5'-CCTGTAGTTCGGCGACTTTC-3'	<i>nirS</i>	58°C
norB F	5'-CTACAACCCGAAAACTCA-3'	<i>norB</i>	58°C
norB R	5'-AGCCAATTCTCGATCACCTC-3'	<i>norB</i>	58°C
nosZ F	5'-ACGACGGCAAGTACCTGTTC-3'	<i>nosZ</i>	58°C
nosZR	5'-AGAACACGTAGCGGGTATGC-3'	<i>nosZ</i>	58°C
pcrV F	5'-CGATGAGTACCCCTTCGAGA-3'	<i>pcrV</i>	58°C
pcrV R	5'-ATTTCTGGATGAAGCGGTTG-3'	<i>pcrV</i>	58°C
phzB2 F	5'-GCGAGACGGTGGTCAAGTAT-3'	<i>phzB2</i>	58°C
phzB2 R	5'-AATCCGGAAGCATTTTCAG-3'	<i>phzB2</i>	58°C
popD F	5'-ACACGGTGATCCAGTCCTTC-3'	<i>popD</i>	58°C
popD R	5'-CTGGTTATGGCTCTGGGTGT-3'	<i>popD</i>	58°C
pqsA F	5'-CAATACACCTCGGGTCCAC-3'	<i>pqsA</i>	58°C
pqsA R	5'-TGAACCAGGGAAAGAACAGG-3'	<i>pqsA</i>	58°C
pqsE F	5'-GACATGGAGGCTTACCTGGA-3'	<i>pqsE</i>	58°C
pqsE R	5'-CTCAGTTCGTCGAGGGATTC-3'	<i>pqsE</i>	58°C
rhIR F	5'-GTTGCATGATCGAGTTGCTG-3'	<i>rhIR</i>	58°C
rhIR R	5'-CTCAGGATGATGGCGATTTTC-3'	<i>rhIR</i>	58°C
rpsL F	5'-GCAAGCGCATGGTCACAAGA-3'	<i>rpsL</i>	58°C
rpsL R	5'-CGCTGTGCTCTTGCAGTTGTGA-3'	<i>rpsL</i>	58°C

**Tabla 3.3.** Lista de cebadores utilizados en este trabajo

### 3.7.2 Experimentos de Análisis transcriptómico

Para los experimentos de análisis transcriptómico todas las cepas se cultivaron en las condiciones descritas previamente. Los cultivos fueron crecidos hasta llegar a una  $DO_{600}$  de 0,6 y luego se diluyeron hasta una  $DO_{600}$  de 0,01 con el fin de sincronizarlos.

Para el análisis del transcriptoma en fase logarítmica los cultivos se recogieron a una  $DO_{600}$  de 0,6, mientras que para fase estacionaria se hizo a una  $DO_{600}$  de 2,0. Para evitar la degradación del ARN, las muestras fueron tratadas durante 10 minutos con RNAProtect® (QUIAGEN) en una relación 1:1. La extracción de ARN se realizó como se ha descrito anteriormente. Los experimentos se hicieron

por triplicado en días diferentes. La síntesis, la fragmentación, el etiquetado del ADNc, la hibridación y el procesamiento del GeneChips (Affimetrix de *P. aeruginosa*) se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España).

Los resultados fueron visualizados en el programa de análisis FIESTA (249) y como criterio de expresión diferencial fueron seleccionados aquellos genes con una expresión relativa superior o igual (positivo o negativo) a 2,5 y con un  $p < 0,05$  (FDR Limma) respecto a la cepa silvestre.

### 3.7.3 RT-PCR en Tiempo Real

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 10 µg de ARN total. Esta síntesis fue realizada con el sistema “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems). La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en un equipo ABI PRISM 7300 utilizando el sistema “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems). En la reacción los cebadores se utilizaron a una concentración de 100 nM y se agregaron 50 ng de ADNc aproximadamente. El ensayo se hizo por triplicado tanto biológico como técnico y los genes *rpsL* y *gapA* fueron usados como control para normalizar los resultados de expresión obtenidos en *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente. La expresión relativa de cada uno de los genes se calculó siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Los cebadores utilizados en los experimentos de RT-PCR en tiempo real se recogen en la tabla 3.3.

## 3.8 Manipulaciones genéticas

### 3.8.1 Preparación de células competentes y transformación

Para transformar *E. coli* se siguió el protocolo estándar de  $\text{CaCl}_2$  descrito por Sambrook y Russell (2001).

Con el fin de preparar células químicamente competentes de *P. aeruginosa*, los cultivos se crecieron hasta una  $\text{DO}_{600}$  de 0,5. A continuación, las células fueron centrifugadas a  $6000 \times g$ , durante 5 minutos a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en 150 mM de  $\text{MgCl}_2$ , en un quinto del volumen inicial y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 200 µl de 150 mM de  $\text{MgCl}_2$  previamente enfriado. Estas células fueron utilizadas inmediatamente para la transformación.

La transformación de las bacterias se llevó a cabo mediante un procedimiento de choque térmico. Tras la adición del ADN plasmídico a las células competentes, la mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos. A continuación se dio un choque térmico de 3 minutos a 37°C; transcurrido este tiempo las células fueron incubadas nuevamente en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se le añadió 1 ml de LB y se incubó a 37°C en agitación constante a 250 rpm durante una hora. Pasado ese tiempo se sembraron 20 y 200 µl en placas con los medios y antibióticos adecuados

### 3.8.2 Construcción del mutante de delección en el gen *nirS* en las cepas PT5 y PT149

La construcción del mutante de delección en el gen *nirS* se realizó mediante recombinación homóloga utilizando el vector suicida pEX18Ap (Hoang y cols., 1998). Dos fragmentos (A y B) de 1000 pb que flanquean al gen *nirS* en el cromosoma, fueron amplificados por PCR utilizando los cebadores descritos en la tabla 3.3. Los productos de la amplificación fueron verificados por electroforesis en

gel de agarosa y posteriormente purificados. Estos amplicones fueron utilizados como molde en una segunda reacción de PCR dando origen al fragmento AB de 2000 pb.

Utilizando el sistema Fail Safe™ PCR System (Epicentre Biotechnology) se realizaron las dos amplificaciones con las siguientes condiciones: 95°C durante 10 min, desnaturalización inicial; 30 ciclos de calentamiento a 94°C durante 1 min, 58 ° C durante 1 min, y 72 ° C durante 3 min, y 72 ° C durante 10 min, extensión final.

El fragmento AB se purificó desde gel, se digirió con la enzima de restricción *Hind*III y se clonó en el plásmido pEX18Ap , generando el plásmido pNIRS3.

El gen fue eliminado del cromosoma de *P. aeruginosa* mediante recombinación homóloga en dos pasos. Primero, *E. coli* S17-1-pNIRS3 se conjugó con las cepas correspondientes de *P. aeruginosa*. Esto conduce a la integración del plásmido en el cromosoma, por un evento simple de recombinación homóloga. Los transconjugantes, se seleccionaron en medio PIA con carbenicilina (350 µg/ml). Las colonias resistentes a carbenicilina son a su vez sensibles a sacarosa debido a la síntesis de compuestos tóxicos por el producto del gen *sacB* presente en el vector. Para el segundo paso, las colonias resistentes se sembraron por agotamiento en medio PIA suplementado con sacarosa (10% p/v) y se incubaron a 30°C durante 72 horas. Esto permitió la selección de un segundo evento de recombinación en el que el plásmido junto con el gen de interés son eliminados de la célula. La eliminación del gen se confirmó mediante PCR.

### 3.8.3 Construcción de los mutantes de complementación de los genes *kynA* y *kynB*

Los genes *kynA* y *kynB* se obtuvieron mediante amplificación por PCR a partir de ADN genómico de *P. aeruginosa* utilizando el sistema Fail Safe™ PCR System (Epicentre Biotechnology). Una vez obtenidos los productos se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y fueron secuenciados. Los fragmentos de ADN se recuperaron mediante la digestión con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Bam*HI y se ligaron por separado en el plásmido pUCP24, dando origen a los plásmidos pUC*kynA* y pUC*kynB*. Los genes clonados en este plásmido se encuentran bajo control del promotor *lac*.

Células competentes de la cepa de *E. coli* OneShot® Omnimax™ (Invitrogen) fueron transformadas con los plásmidos pUC*kynA* y pUC*kynB* y seleccionadas en medio LB que contenía 15 µg/ml de gentamicina. Posteriormente, el plásmido se purificó para ser usado en la transformación de las diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Las colonias se seleccionaron en medio LB que contenía 50 µg/ml de gentamicina.

Las cepas complementadas con los genes *kynA* y *kynB*, de forma independiente, fueron crecidas en medio LB con 1 mM de IPTG para inducir su expresión.

## 3.9 Detección de los intermediarios de la síntesis de PQS

### 3.9.1 Extracción de PQS y HHQ

PQS y HHQ se extrajeron en fase estacionaria temprana (aproximadamente seis horas después de la inoculación y una DO<sub>600</sub> de 2,0) y en fase estacionaria tardía (14 horas después de la inoculación y una DO<sub>600</sub> de 2,6), según el protocolo descrito previamente por Fletcher, y cols. (2007) y Collier, y cols. (2002). Se recuperaron 11 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 11000 x g a 4°C durante 10 minutos. Los sobrenadantes y los sedimentos celulares se separaron para extraer ambas moléculas de cada uno

de ellos.

El sedimento de células fue lavado con 10 ml de medio LB, el sobrenadante fue descartado, el sedimento se resuspendió en 10 ml de metanol y se agitó vigorosamente con vórtex. La mezcla se pasó a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  para eliminar cualquier residuo celular.

Por otra parte, el sobrenadante de los cultivos, fue filtrado con una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ , se mezcló con 10 ml de acetato de etilo acidificado y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se separó en dos tubos, los cuales se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos hasta que se observó la separación de las dos fases. Se recuperó la capa orgánica superior y se llevó a un tubo nuevo.

Tanto la mezcla del extracto celular como del sobrenadante, se llevaron en forma independiente a matraces de 250 ml (previamente lavados con acetona) y se secaron a temperatura ambiente bajo una campana de extracción. Una vez seco el fondo del matraz, se agregaron 2 ml de metanol (grado HPLC), se agitó por 30 segundos y se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{l}$ . Este procedimiento se repitió dos veces por cada muestra. Las muestras se secaron con un flujo constante de nitrógeno gaseoso y fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

### 3.9.2 Detección de HHQ y PQS mediante cromatografía en capa fina

Las muestras de sobrenadantes de cultivo y extracto celular, obtenidas previamente fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina. Una lámina de gel de sílice 60<sub>F254</sub> (Merck) se sumergió en una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 5% (p/v) y luego fue calentado por una hora a  $100^{\circ}\text{C}$  para su activación. A continuación, el gel de sílice se secó a temperatura ambiente. Las muestras extraídas se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de metanol de los cuales se cargaron 30  $\mu\text{l}$  gota a gota (5  $\mu\text{l}$ ) en la lámina de gel de sílice.

Como control positivo se utilizaron 2  $\mu\text{l}$  de 10 mM de PQS y HHQ sintéticos los cuales fueron adquiridos en el laboratorio de Paul Williams de la Universidad de Nottingham. La cromatografía se realizó con una mezcla de diclorometano:metanol (95:5) como solvente para la movilización. La lámina de sílice se sacó de la cámara con el solvente cuando el frente se encontraba a 1-2 centímetros del final del gel y se dejó secar a temperatura ambiente.

La detección de las muestras se realizó utilizando la cepa PAO1 *pqsACTX-lux::pqsA* de *P. aeruginosa* que actúa como biosensor, de acuerdo a lo descrito por Fletcher, y cols. (2007).

### 3.9.3 Determinación de la presencia de kinurenina en el sobrenadante de cultivos mediante HPLC y espectrometría líquida de masas (MS)

Con el fin de detectar la presencia de kinurenina en el sobrenadante de los cultivos, las cepas de *P. aeruginosa* se crecieron en medio M63 con triptófano como única fuente de carbono. Cuando los cultivos alcanzaron la fase logarítmica ( $\text{DO}_{600}$  entre 0,2 y 0,3) se centrifugaron a  $11000 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante fue recuperado.

Los sobrenadantes fueron liofilizados y resuspendidos en 1 ml de metanol (Grado HPLC). Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Cromatografía-Sidi de la Universidad Autónoma de Madrid por HPLC-MS. Para ello, se utilizó una columna de afinidad C18 (150x4.6 mm, 4 micras) y la fase móvil consistió en un sistema de 2 solventes; (i) acetato de amonio (10 mM, pH 6,8) y (ii) metanol. Para la separación de las diferentes moléculas se utilizó un flujo de 0,5 ml/min y la lectura se llevó a cabo

con un detector de luz UV a una longitud de onda de 360 nm.

El análisis de espectrometría de masas se realizó en los eluidos seleccionados mediante detección de iones (SIM) positivos para la kinurenina. En la detección se utilizaron los siguientes valores: fragmentador: 60V; secado de flujo de gas: 10 ml/min; presión del nebulizador: 60 psig; temperatura de secado de gas: 300°C; temperatura del vaporizador: 250°C; tensión capilar: 2000 V; corona: 5μA y la tensión de carga: 2000 V. Se utilizó L-kinurenina (Sigma) como estándar de las muestras.

### 3.10 Ensayo de virulencia en el modelo de *Caenorhabditis elegans*

En los ensayos de virulencia se utilizó como modelo la cepa Bristol N-2 de *C. elegans* proporcionada por el laboratorio del profesor Alfonso Navas del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid. Los nematodos se mantuvieron a 18°C en placas de medio PDA alimentados con la cepa OP50 de *E. coli*. El experimento se llevó a cabo según el método descrito previamente (Mahajan-Miklos y cols., 1999; Navas y cols., 2007; Ruiz-Diez y cols., 2003).

Una vez crecidas las cepas de *P. aeruginosa* se sembraron en placas de 12 pocillos que contenían 1,5 ml de medio PDA y fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se dejaron incubar durante 12 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se sembraron 5 hembras grávidas por pocillo y se incubaron a 18°C. Antes de sembrar los nematodos en las placas, fueron pasados por un filtro de arena estéril y luego resuspendidos en agua bi-distilada estéril para eliminar cualquier contaminación con *E. coli* OP50.

Cada día se contó el número de nematodos y los resultados se expresaron como variación de la población después de 7 días de co-cultivo. Estos experimentos fueron repetidos en 6 ocasiones.

### 3.11 Cultivos suplementados con oxígeno

Para comprobar el efecto de la adición de oxígeno sobre el funcionamiento de las bombas tipo RND, se crecieron las diferentes cepas de *P. aeruginosa* (PT5, PT149 y PT637) en un fermentador MD BIOSTAT equipado con un recipiente de cultivo de 2 litros. Los experimentos se realizaron con un volumen de 1,5 litros de medio LB. Los cultivos se agitaron a 650 rpm y se adicionó aire a una velocidad de flujo de 300 ml/min. Como control del experimento se utilizaron cultivos agitados a 650 rpm sin la adición de aire.

El porcentaje de saturación de oxígeno fue monitoreado con un sensor, el cual se calibró a un 0% de O<sub>2</sub> con un 99,8% de nitrógeno. El 100% se calibró agitando el medio LB (sin bacterias) a 650 rpm y la adición constante de aire a una velocidad de flujo de 300ml/min. El 100% de saturación equivale a un 20% de oxígeno, de acuerdo con el porcentaje de este en el aire.

Los cultivos del fermentador se iniciaron a una DO<sub>600</sub> de 0,01, con un inóculo de bacterias crecidas durante 18 horas. La turbidez del cultivo se midió cada 30 minutos. Con este dato se calculó el tiempo de duplicación de cada una de las cepas.

### 3.12 Medición del consumo de oxígeno

Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron con un oxímetro Oxygraph® (Hansatech) equipado con un electrodo Clark. El consumo de oxígeno se midió tanto en fase exponencial (DO<sub>600</sub> 0,6) como en fase estacionaria (DO<sub>600</sub> 2,0). Se tomaron 2 ml de cada cultivo y se colocaron en la cámara

de medición. En forma paralela, 2 ml de cultivo fueron liofilizados con el fin de obtener el peso seco de la muestra. Los resultados se expresaron como tasa de consumo de oxígeno en  $\text{nmol de O}_2 \text{ consumido} \times \text{min}^{-1} \times \text{gr}^{-1}$  de cultivo.

### 3.13 Medición de la concentración de de óxido nítrico (NO) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en el medio

Alícuotas de 1 ml de cultivo de *P. aeruginosa*, fueron centrifugadas a  $7000 \times g$  durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado con una membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  y  $85 \mu\text{l}$  de esta muestra fueron utilizados para determinar la concentración de NO y  $\text{NO}_3^-$ .

La producción de NO y el consumo de  $\text{NO}_3^-$  se midieron utilizando el sistema Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit (Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.14 Obtención del medio LB carente de nitrato

A lo largo de la elaboración del presente trabajo se pudo comprobar que el mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN consume todo el nitrato presente en el medio LB trascurridas 24 horas de cultivo. Para analizar como afectaba la falta de nitrato en el comportamiento de los diferentes mutantes del sistema MexT-MexEF-OprN, se creció la cepa PT149 en 250 ml de medio LB (Matraz de un litro), durante 24 horas.

El cultivo fue centrifugado 2 veces durante 1 hora a  $9000 \times g$ . A continuación se ajustó el pH a 7,0 con 2M de HCl y se esterilizó al ser pasado por filtros de  $0,45 \mu\text{m}$  y  $0,2 \mu\text{m}$  en forma secuencial.

Se comprobó la concentración de nitrato y se dejó en agitación a  $37^\circ\text{C}$  durante toda la noche para descartar cualquier contaminación. Este medio se utilizó para pruebas de cálculo de velocidad de crecimiento y experimentos de competición utilizando los protocolos descritos anteriormente





## RESULTADOS

---



## 4 Resultados

### 4.1 Caracterización de las cepas utilizadas en este trabajo

Con el fin de analizar los cambios en la fisiología causados por la sobre-expresión de una bomba de la familia RND, utilizamos como modelo el sistema MexEF-OprN de *P. aeruginosa*. A diferencia de lo que ocurre con otros miembros de esta familia, la expresión de MexEF-OprN se activa mediante la unión del regulador transcripcional MexT (Kohler y cols., 1997; Maseda y cols., 2000a; Maseda y cols., 2000b). En la cepa silvestre utilizada en este trabajo, el gen que codifica este regulador presenta una inserción de 8 pb provocando una pérdida en el marco de lectura, lo que conlleva la traducción de una forma no funcional de la proteína (Kohler y cols., 1999). Además de inducir la expresión de MexEF-OprN, el alelo funcional de MexT inhibe en forma indirecta la expresión de la porina OprD2, aumentando la resistencia al carbapenémico imipenem (Kohler y cols., 1999; Kohler y cols., 2001). Con el objetivo de analizar independientemente los efectos de la bomba, los del regulador MexT y los debidos a la disminución de la expresión de la porina OprD2, se utilizaron mutantes en cada uno de estos componentes: PT5: La cepa silvestre (PAO1 almacenada en Ginebra); PT149: La cepa que sobre-expresa MexEF-OprN como consecuencia de la expresión del alelo funcional de MexT; PT364: Cepa que produce una forma no funcional de la porina OprD2 y PT637: Cepa que expresa el alelo funcional de MexT, pero no expresa la bomba MexEF-OprN. Estas cepas fueron facilitadas por el laboratorio de Thilo Köhler (Kohler y cols., 1999; Kohler y cols., 1997). Para cada una de ellas se secuenció el gen *mexT* y confirmamos que PT5 presenta la inserción de 8 pb característica que inactiva a este gen, impidiendo la expresión de MexEF-OprN. Por otra parte, observamos que la cepa PT149 no presenta la inserción de 8 pares de bases en el gen *mexT*, lo que posibilita la expresión de MexEF-OprN. PT364 presentó la misma secuencia que PT5 y finalmente la cepa PT637 no presentó la inserción de 8 pb, lo que indica que expresa el alelo funcional del activador MexT.

Trabajos anteriores han demostrado que la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN tiene como consecuencia el aumento de la resistencia a los antibióticos (i) cloranfenicol, (ii) fluoroquinolonas y (iii) trimetoprim. (Kohler y cols., 1999; Linares y cols., 2005; Maseda y cols., 2000a). Para determinar el fenotipo de resistencia se estimó la CMI de un grupo de antimicrobianos seleccionado. En la tabla 4.1 podemos observar que la cepa PT149 presenta altos niveles de resistencia a cloranfenicol, ciprofloxacina, trimetoprim e imipenem; a su vez las cepas PT364 y PT637 sólo presentaron altos niveles de resistencia a imipenem. Esto sugiere que los antibióticos cloranfenicol, ciprofloxacina y trimetoprim están siendo expulsados por la bomba, mientras que la resistencia a imipenem está mediada por la disminución de la expresión de la porina OprD2.

Mutantes	CMI (µg/ml)			
	Cloranfenicol	Ciprofloxacina	Trimetoprim	Imipenem
PT5	12	0.094	100	2
PT149	1024	1	256	4
PT637	12	0.094	100	4
PT364	12	0.094	100	4

**Tabla 4.1.** Determinación de la CMI mediante E-test® de los mutantes del sistema MexEF-OprN

## 4.2 Estimación del coste de *fitness* relativo en medio LB

### 4.2.1 Crecimiento en diferentes medios de cultivo

Uno de los mecanismos utilizados para estimar el coste de *fitness* de un organismo, es el cálculo de la velocidad de crecimiento en un medio determinado. Con el fin de analizar el efecto de la sobre-expresión de MexEF-OprN, de la activación de MexT y la pérdida de OprD2 de modo independiente, sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*, se calculó el tiempo de duplicación de las diferentes cepas crecidas en distintos medios de cultivo. Los medios utilizados para este fin fueron: LB y medio mínimo M63 que contiene una de las siguientes fuentes de carbono: 10 mM de succinato, 10 mM de citrato y 20 mM de piruvato. Las cepas fueron también crecidas en un medio definido que imita las condiciones nutricionales del esputo de los enfermos de fibrosis quística (SCFM) (Palmer y cols., 2007). En ninguno de estos medios el crecimiento de las cepas analizadas fue diferente al de la cepa silvestre (PT5) (Tabla 4.2). PT149 a pesar de expresar constitutivamente la bomba MexEF-OprN no presenta ninguna diferencia respecto a PT5 en ninguno de los medios probados ya que todos los tiempos de duplicación son muy similares.

Medio Utilizado	Tiempo de Duplicación (min)		
	PT5	PT149	PT637
Luria-Bertani (LB)	38 ± 3	37 ± 2	38 ± 2
Medio artificial esputo enfermo fibrosis quística (SCFM)	31 ± 2	32 ± 2	32 ± 3
M63 + Succinato (10mM)	46 ± 2	47 ± 2	44 ± 2
M63 + Malato (10mM)	49 ± 4	52 ± 3	48 ± 3
M63 + Piruvato (20mM)	56 ± 6	58 ± 5	53 ± 5

**Tabla 4.2. Tiempo de duplicación de las cepas del sistema MexEF-OprN crecidas en diferentes medios de cultivo.** Los cultivos fueron realizados por duplicado en tres días diferentes. Los valores mostrados son la media del tiempo de duplicación obtenido en cada uno de los experimentos.

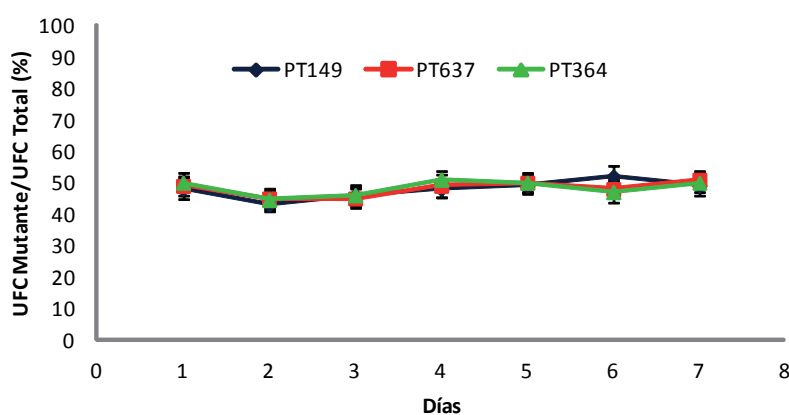
Por otra parte PT637, que presenta la forma activa de MexT pero que no expresa la bomba, tampoco presentó diferencias respecto de la cepa silvestre. El activador transcripcional de la bomba MexT, regula también la expresión de otros genes (Kohler y cols., 1999), sin embargo, su activación no afecta el crecimiento de *P. aeruginosa*. Finalmente, el mutante PT364 el cual expresa una forma no funcional de la porina OprD2, que es la vía de ingreso de aminoácidos básicos al interior de la célula (Fukuoka y cols., 1993), presenta una velocidad de crecimiento muy similar a la cepa silvestre (Tabla 4.2). En base a estos resultados de velocidad de crecimiento, podemos decir que la adquisición de una mutación que activa la sobre-expresión del sistema MexEF-OprN, no implicaría un coste en el *fitness* de *P. aeruginosa*, en las condiciones analizadas.

### 4.2.2 Ensayos de competición de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN con la cepa silvestre

Una vez demostrado que los mutantes presentan una tasa de crecimiento similar a la cepa silvestre en distintos medios, se realizaron experimentos de competición. En este tipo de ensayos un

mutante (resistente) se pone a competir por los recursos en un mismo medio con la cepa silvestre (susceptible) (Lenski, 1991). Si uno de los participantes es más eficaz que el otro en la utilización de estos recursos, eliminará a la otra cepa del cultivo. De esta forma, cualquier defecto en el *fitness* provocado por la activación del sistema MexEF-OprN se traduciría en un desplazamiento por parte de la estirpe silvestre.

Cada una de las cepas (PT149, PT637 y PT364) se puso a competir en medio LB con la cepa silvestre (PT5) (Figura 4.1), después de 7 días de pases sucesivos ninguna de ellas pudo superar a la cepa silvestre y viceversa. Para ver si algún efecto en el *fitness* se podía apreciar; se calculó el *fitness* relativo (Sander y cols., 2002) cuyo valor para PT149 fue de 0,970. Este valor tan cercano a uno indica que ninguna cepa es más eficaz que la otra. Lo mismo sucedió con PT637 y PT364 con valores de 0,988 y 0,978 respectivamente. En base a estos resultados podemos decir que ni la sobre-producción de la bomba MexEF-OprN, ni la activación de MexT, ni los menores niveles de expresión de la porina OprD2 causan un coste de *fitness* en *P. aeruginosa* cuando se utilizan métodos clásicos de análisis.



**Figura 4.1. Estimación del *fitness* relativo de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN mediante ensayos de competición.** Las cepas PT149, PT637 y PT364 se crecieron en co-cultivo con la cepa silvestre PT5. Ninguna cepa fue capaz de eliminar a la otra del medio. La sobre-expresión de MexEF-OprN, la expresión del alelo funcional de MexT y la disminución de la producción de la porina OprD2 no causan un coste en el *fitness* de *P. aeruginosa*.

#### 4.3 Análisis del transcriptoma de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN en las distintas fases de crecimiento

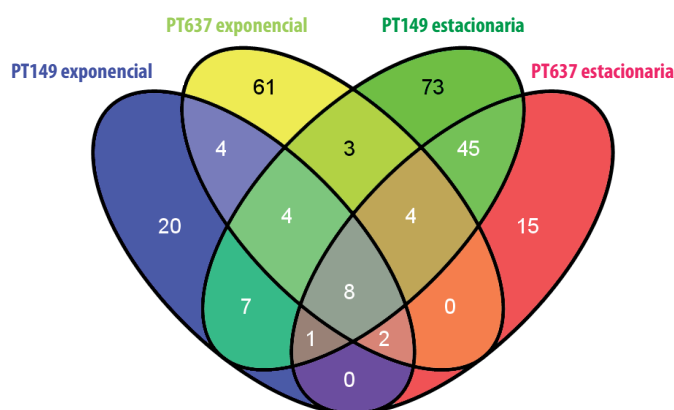
Los experimentos anteriores indican que la sobre-expresión del sistema MexEF-OprN no causa un coste de *fitness* medido por experimentos clásicos, no obstante, si podría provocar cambios que afectan a la fisiología del organismo.

Con el fin de aislar los efectos causados por la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN de aquellos causados por la activación de MexT y de aquellos en los cuales podría tener implicación OprD2, se comparó el transcriptoma de las cepas PT149, PT637 y PT364 con el de la cepa silvestre PT5 tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento.

Como criterios de expresión diferencial fueron seleccionados aquellos genes con una expresión relativa superior o igual (positivo o negativo) a 2,5 y con un  $p < 0,05$  (FDR Limma) respecto a la cepa silvestre. Es así como encontramos que 46 genes cumplían con estas características en fase logarítmica

para la cepa PT149 y 86 lo hacían para la cepa PT637 (Tabla 4.3). Los mismos parámetros se utilizaron con los datos obtenidos en fase estacionaria y aquí encontramos que 147 genes fueron expresados diferencialmente en la cepa PT149 y 76 en la cepa PT637 (Tabla 4.3). En lo que respecta a la cepa PT364, con excepción del gen *OprD2*, no encontramos ningún gen expresado diferencialmente en base a los parámetros de selección establecidos, de allí que esta cepa fue descartada para cualquier análisis posterior.

Los únicos genes que se expresaron diferencialmente en todas las cepas estudiadas en ambas fases de crecimiento fueron: PA2486, PA2491 (*mexS*), PA2493 (*mexE*), PA2812, PA2813, PA3229, PA4356 (*xenB*) y PA4881 (Figura 4.2). Todos estos genes, entre los que se encuentra el propio *mexE*, podrían estar regulados directa o indirectamente por MexT. Algunos de ellos fueron descritos como parte del regulón de MexT, cuando esta proteína se sobre-expresa en un plásmido en *P. aeruginosa* (Tian y cols., 2009b).



**Figura 4.2. Análisis del transcriptoma de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN.** Diagrama de Venn donde se aprecia la agrupación de los genes en las cepas PT149 (sobre-expresión de MexEF-OprN) y PT637 (alelo funcional de MexT) en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento.

#### 4.3.1 Genes regulados diferencialmente en fase exponencial

Mediante el análisis exhaustivo de los genes regulados diferencialmente en fase exponencial en las diferentes cepas, logramos identificar cuales son los genes cuya regulación es debida a la acción de MexT y cuales debida a la sobre-expresión de la bomba. Es así como encontramos que algunos elementos del Sistema de Secreción Tipo VI (SST6), los genes PA0085 (*hcp1*) y PA0090 (*cpIV1*) presentan una expresión mucho menor en las cepas PT149 y PT637 (Tabla 4.3) lo que sugiere que podrían estar regulados directa o indirectamente por MexT. En esta misma situación se encuentran los genes PA1001 (*phnA*) y PA1002 (*phnB*) los cuales están involucrados en la síntesis de antranilato, molécula que participa en *quorum sensing* en *P. aeruginosa* y de la cual se hablará más adelante.

En esta fase de crecimiento también encontramos que hay genes cuya variación en la expresión es debida exclusivamente al funcionamiento de la bomba ya que sólo aparecieron en la cepa PT149 y no en PT637. Entre ellos podemos encontrar genes involucrados en la cadena respiratoria de nitrato, como PA0523 (*norC*) y PA3392 (*nosZ*) los cuales aumentan su expresión en fase logarítmica y la

disminuyen en fase estacionaria (Tabla 4.3). También es el caso del gen PA2664 (*fhp*) que codifica una flavo-hemo-proteína cuya función es participar en la desintoxicación de óxido nítrico en condiciones aerobias (Arai y cols., 2005). Estos resultados podrían indicar que la cadena respiratoria de nitrato, con su consiguiente producción de óxido nítrico estaría activada bajo condiciones aerobias cuando se sobre-produce MexEF-OprN. Existen otros genes que también cambian su expresión debido a la acción de la bomba pero serán analizados en el contexto de genes involucrados en *quorum sensing*.

#### 4.3.2 Genes regulados diferencialmente en fase estacionaria

Después de analizar los resultados obtenidos en fase estacionaria, encontramos que en PT149 un 75% de los genes que varían su expresión (64 de un total de 86) pertenecen al regulón de *quorum sensing* descrito por Schuster, y cols. (2003) y por Wagner, y cols. (2003). De estos 64 genes sólo tres aumentaron su expresión, mientras que los otros la disminuyeron al ser comparados con la cepa silvestre. La mayoría de los genes que disminuyen su expresión son dependientes del sistema *rhl* (Tabla 4.4) (Schuster y cols., 2003). La vía *rhl* controla la expresión del factor sigma de fase estacionaria RpoS y entre otras cosas regula la expresión de genes responsables de la producción de ramnolípidos (de Kievit y Iglewski, 2000). Estos resultados sugieren que PT149 podría perder su capacidad de virulencia debido a la ausencia de estos elementos.

De los genes que más disminuyeron su expresión podemos mencionar la bomba MexGHI-OpmD, ya que disminuye su expresión 84 veces, respecto a la cepa silvestre, en la cepa PT149. Esta bomba participa en la desintoxicación intracelular del antranilato (Aendekerk y cols., 2005; Aendekerk y cols., 2002) y la disminución en la expresión podría estar relacionada con la baja disponibilidad de este compuesto en el interior de la célula (ver apartado 4.3). Entre estos genes también podemos nombrar a uno de los operones que codifica la producción de fenazinas *phzABCDEFG2*. Estos genes también disminuyen su expresión y podría ser una de las causas de la reducción en la pigmentación presentada por la cepa PT149.

Otro de los hallazgos de este análisis es que en la cepa PT149 los genes de la cadena respiratoria de nitrato disminuyen su expresión en esta fase de crecimiento. Resultado opuesto a lo encontrado en la fase exponencial. Esto sugiere que la activación de esta cadena respiratoria podría ser causada por la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN

Además, encontramos que algunos genes del regulón de *quorum sensing* presentan una disminución en la expresión al ser comparados con la cepa silvestre en fase exponencial. Es el caso de los operones *hcnABC* y PA3327-PA3334 cuya expresión aparece disminuida únicamente en esta fase de crecimiento (Tabla 4.4). Bajo condiciones de laboratorio la regulación de los sistemas de *quorum sensing* ocurre al inicio de la fase estacionaria (Gambello y Iglewski, 1991; Passador y cols., 1993), pero también se ha descrito que la regulación puede ocurrir en fases más tempranas del crecimiento (Williams y Camara, 2009).

La disminución en la expresión de estos genes podría deberse a que la concentración intracelular de alguna señal de *quorum sensing* decae a causa de la sobre-expresión de MexEF-OprN. Se ha indicado que los sistemas MexAB-OprM y MexEF-OprN podrían expulsar moléculas autoinductoras de *quorum sensing* (Kohler y cols., 1999; Pearson y cols., 1997). Es de suponer, por tanto, que cuando los sistemas MDR se sobre-expresan, la concentración intracelular de estos inductores se encontraría por debajo del límite necesario para que los genes regulados por *quorum sensing* sean activados.

Nº Gen	Descripción	Expresión relativa a la cepa silvestre			
		PT149 vs PT5		PT637 vs PT5	
		Fase Exp	Fase Est	Fase Exp	Fase Est
PA0059	<i>osmC</i> , Proteína inducible por cambios de osmolaridad	SC	-3	SC	SC
PA0084	Proteína SST6	-2.2	SC	-2.7	SC
PA0085	SST6 HCP1	-3.4	SC	-3.6	SC
PA0263	<i>hcpC</i> , Proteína de secreción	-4	-9.5	SC	SC
PA0283	<i>sbp</i> , Precursor de proteína de unión a sulfato	SC	2.5	SC	SC
PA0509	<i>nirN</i> , Probable citocromo tipo C	SC	SC	SC	4.3
PA0511	<i>nirJ</i> , Proteína de biosíntesis de grupo Hemo d1	SC	SC	SC	4.7
PA0523	<i>norC</i> , Subunidad C Óxido nítrico reductasa	5.1	-27	SC	SC
PA0527	<i>dnr</i> , Regulador Transcripcional DNR	SC	SC	5	SC
PA0579	<i>rpsU</i> , Proteína S21 de la Subunidad 30S del ribosoma	SC	SC	4.5	SC
PA0918	Citocromo b561	SC	-1.9	-3.5	SC
PA0958	<i>oprD</i> , Proteína transportadora amonócadidos básicos	-3.9	SC	-6.6	SC
PA0996	<i>pqsA</i> , Probable coenzima ligasa A	-4.8	SC	SC	SC
PA0998	<i>pqsC</i> , Proteína del tipo beta-ceto-acil-acil-carrier	SC	SC	-2.5	SC
PA0999	<i>pqsD</i> , Proteína Sintasa III del 3-oxoacyl-acyl-carrier	SC	SC	-2.6	SC
PA1000	<i>pqsE</i> , Proteína síntesis PQS	-6.9	SC	-2.3	-1.6
PA1001	<i>phnA</i> , Antranilato sintasa	-13	-1.6	-3	-2.8
PA1002	<i>phnB</i> , Antranilato sintasa	-6.7	-1.7	-3.1	-2.6
PA1150	<i>pys2</i> , Piocina S2	SC	SC	-2.6	SC
PA1421	<i>gbuA</i> , Guanidinobutirasa	SC	SC	3.5	SC
PA1581	<i>sdhC</i> , Succinato deshidrogenasa (Subunidad C)	SC	SC	3.6	SC
PA1806	<i>fabI</i> , Enoil-ACP reductasa dependiente de NADH	SC	SC	-2.8	SC
PA1901	<i>phzC2</i> , Proteína de la biosíntesis de fenazinas	-31	-8.9	SC	SC
PA1902	<i>phzD2</i> , Proteína de la biosíntesis de fenazinas	SC	-8.7	SC	SC
PA1903	<i>phzE2</i> , Proteína de la biosíntesis de fenazinas	SC	-11	SC	SC
PA1904	<i>phzF2</i> , Proteína de la biosíntesis de fenazinas	SC	-11	SC	SC
PA1905	<i>phzG2</i> , Probable piridoxamina 5-fosfato oxidasa	SC	-12	SC	SC
PA1946	<i>rbsB</i> , Precursor de transportador de ribosa	SC	-32	-4.4	-38
PA1947	<i>rbsA</i> , Proteína transportadora de ribosa	SC	-8	SC	-9.2
PA1948	<i>rbsC</i> , Proteína miembro de transportador de ribosa	SC	-3.7	SC	-4.6
PA1949	<i>rbsR</i> , Represor de asimilación de ribosa	SC	-9.5	SC	-11
PA1950	<i>rbsK</i> , Riboquinasa	SC	-19	-2.8	-25
PA2012	<i>gnyA</i> , Geranoil-CoA carboxilasa, subunidad alfa	SC	SC	-2.7	SC
PA2128	<i>cupA1</i> , Proteína estructural de la fimbria	SC	4.3	SC	SC
PA2153	<i>glgB</i> , Enzima de síntesis de 1,4-alfa-glicano	SC	-3.1	SC	SC
PA2193	<i>hcnA</i> , Ácido cianhídrico sintetasa	-9.3	SC	SC	SC
PA2194	<i>hcnB</i> , Ácido cianhídrico sintetasa	-6.9	SC	SC	SC
PA2195	<i>hcnC</i> , Ácido cianhídrico sintetasa	-7.1	SC	SC	SC
PA2248	<i>bkdA2</i> , 2-oxoisovalerato dehidrogenasa	SC	SC	-2.8	SC
PA2250	<i>lpdV</i> , lipoamide dehidrogenasa-Val	SC	SC	-2.5	SC
PA2300	<i>chiC</i> , Quitinasa	SC	-13	SC	SC
PA2414	L-sorbose deshidrogenasa	SC	-2.7	SC	-1.7
PA2491	<i>mexS</i> , Probable oxidoreductasa	9.6	18	9.3	18
PA2493	<i>mexE</i> , Proteína componente de bomba de expulsión	56	56	6.3	24
PA2494	<i>mex</i> , Proteína componente de bomba de expulsión	94	69	SC	SC
PA2495	<i>oprN</i> , Proteína componente de bomba de expulsión	20	31	SC	SC



Nº Gen	Descripción	Expresión relativa a la cepa silvestre			
		PT149 vs PT5		PT637 vs PT5	
		Fase Exp	Fase Est	Fase Exp	Fase Est
PA2570	<i>pa1L</i> , Lectina galactofílica de <i>Pseudomonas</i>	SC	-17	SC	-4.5
PA2624	<i>idh</i> , Isocitrato deshidrogenasa	SC	2.5	SC	SC
PA2664	<i>fhp</i> , Flavohemoproteína	4.3	-7.3	SC	SC
PA3032	<i>snr1</i> , Citocromo c	SC	-5	SC	-2.6
PA3192	<i>gltR</i> , Regulador de dos componentes	SC	SC	SC	-2.5
PA3331	Citocromo P450	-27	SC	SC	SC
PA3333	<i>fabH2</i> , Proteína 3-oxoacyl-(acil-carrier)	-9	SC	SC	SC
PA3361	<i>lecB</i> , Lectina de unión a flucosa	SC	SC	SC	-3.1
PA3392	<i>nosZ</i> , Óxido nítrico reductasa	11	SC	SC	SC
PA3393	<i>nosD</i>	SC	SC	SC	4.4
PA3394	<i>nosF</i>	SC	SC	SC	5.9
PA3395	<i>nosY</i>	SC	SC	SC	3.9
PA3396	<i>nosL</i>	SC	SC	SC	3.2
PA3418	<i>ldh</i> , Leucine deshidrogenasa	SC	SC	-8.5	SC
PA3790	<i>oprC</i> , Proteína transportadora de cobre	SC	1.7	-4.1	SC
PA3877	<i>narK1</i> , Proteína asimilación de nitrato	SC	-11	-3.4	SC
PA3915	<i>moaB1</i> , Proteína de la síntesis de molibdenopterina	SC	-22	SC	SC
PA4042	<i>xseB</i> , Exo-deoxi-ribonucleasa	SC	1.5	2.5	SC
PA4091	<i>hpaA</i> , 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa	SC	9.8	SC	SC
PA4092	<i>hpaC</i> , 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa	SC	8.2	SC	SC
PA4123	<i>hpcC</i> , 5-carboxi-2-hidroxiuconato semialdehído deshi	SC	6.2	SC	SC
PA4124	<i>hpcB</i> , Homoprotocatecuato 2,3-dioxigenasa	SC	5.2	SC	SC
PA4125	<i>hpcD</i> , 5-carboximetil-2-hidroxiuconato isomerasa	SC	5.6	SC	1.6
PA4175	<i>prpL</i> , Endoproteasa regulada por PvdS, lítica	SC	-3.8	-2.7	SC
PA4205	<i>mexG</i> Proteína componente bomba de expulsión	SC	-87	SC	-8.9
PA4206	<i>mexH</i> , Proteína componente bomba de expulsión	SC	-42	SC	-6.5
PA4207	<i>mexI</i> , Proteína componente bomba de expulsión	SC	-23	SC	-7.4
PA4208	<i>opmD</i> , Proteína bomba de expulsión	SC	-13	SC	-6
PA4211	<i>phzB2</i> , Proteína biosíntesis fenazinas	-60	-13	SC	SC
PA4235	<i>bfrA</i> , Bacterioferritina	SC	SC	SC	2.6
PA4356	<i>xenB</i> , Reductasa xenobiótica	7.8	11	6.4	11
PA4482	<i>gatC</i> , tRNA Glu	SC	2.2	3.8	SC
PA4563	<i>rpsT</i> , Proteína ribosomal subunidad 30S	SC	SC	6.5	SC
PA4661	<i>pagL</i> , 3-O-deacilasa del Lípido A	2.4	SC	2.7	SC
PA4846	<i>aroQ1</i> , 3-deshidroquinato deshidratasa	SC	SC	3.4	SC
PA4876	<i>osmE</i> , Proteína inducida por diferencias de osmolaridad	SC	-2.6	SC	SC
PA4919	<i>pncB1</i> , Nicotinato fosforibosiltransferasa	SC	4.8	SC	SC
PA4920	<i>nadE</i> , Sintetasa de NAD dependiente de NH <sub>3</sub>	SC	2.7	SC	SC
PA4973	<i>thiC</i> , Proteína que participa en la síntesis de tiamina	1.9	6.8	SC	8
PA5058	<i>phaC2</i> , Poli(3-hydroxialcanoic acid) sintetasa 2	SC	-2.6	SC	SC
PA5068	<i>tatA</i> , Proteína de traslocación	SC	SC	2.6	SC
PA5142	<i>hisH1</i> , Glutamina amidotransferasa	SC	SC	2.7	SC
PA5276	<i>lppL</i> , Precursor de lipopéptido	SC	SC	4.8	SC
PA5315	<i>rpmG</i> , Proteína ribosomal L33 de la subunidad 50S	SC	SC	3	SC
PA5337	<i>rpoZ</i> , Subunidad omega ARN polimerasa	SC	SC	3.1	SC
PA5531	<i>tonB</i>	3.2	SC	SC	SC
PA5569	<i>mpA</i> , Ribonucleasa P	SC	SC	4.3	SC
PA5570	<i>rpmH</i> , Proteína ribosomal L34 de la subunidad 50S	SC	SC	5.7	SC

**Tabla 4.3. Resumen de los genes que presentan una expresión diferencial en las cepas PT149 y PT637 en las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento.** En rojo los genes que disminuyen su expresión y en azul los que aumentan (el análisis completo se recoge en la tabla 1 del anexo 1).

Nº Gen	Descripción	Expresión relativa a la cepa silvestre			
		Fase estacionaria		Fase exponencial	
		PT149 vs PT5	PT637 vs PT5	PT149 vs PT5	PT637 vs PT5
PA0059	<i>osmC</i> , Proteína inducible por cambios de osmolaridad	-3	SC	SC	SC
PA0263	<i>hcpC</i> , Proteína de secreción	-9.5	SC	-4	SC
PA0996	<i>pqsA</i> , Probable coenzima ligasa A	SC	SC	-4.8	SC
PA1000	<i>pqsE</i> , Proteína síntesis PQS	SC	-1.6	-6.9	-2.3
PA1001	<i>phnA</i> , Antranilato sintasa	-1.6	-2.8	-13	-3
PA1002	<i>phnB</i> , Antranilato sintasa	-1.7	-2.6	-6.7	-3.1
PA1901	<i>phzC2</i> , Proteína de la biosíntesis de fenazinas	-8.9	SC	-31	SC
PA1902	<i>phzD2</i> , Proteína de la biosíntesis de fenazinas	-8.7	SC	SC	SC
PA1903	<i>phzE2</i> , Proteína de la biosíntesis de fenazinas	-11	SC	SC	SC
PA1904	<i>phzF2</i> , Proteína de la biosíntesis de fenazinas	-11	SC	SC	SC
PA1905	<i>phzG2</i> , Probable piridoxamina 5-fosfato oxidasa	-12	SC	SC	SC
PA2153	<i>glgB</i> , Enzima de síntesis de 1,4-alfa-glicano	-3.1	SC	SC	SC
PA2193	<i>hcnA</i> , Ácido cianhídrico sintetasa	SC	SC	-9.3	SC
PA2194	<i>hcnB</i> , Ácido cianhídrico sintetasa	SC	SC	-6.9	SC
PA2195	<i>hcnC</i> , Ácido cianhídrico sintetasa	SC	SC	-7.1	SC
PA2300	<i>chiC</i> , Quitinasa	-13	SC	SC	SC
PA2414	L-sorbose deshidrogenasa	-2.7	-1.7	SC	SC
PA2570	<i>pa1L</i> , Lectina galactofílica de <i>Pseudomonas</i>	-17	-4.5	SC	SC
PA3032	<i>snr1</i> , Citocromo c	-5	-2.6	SC	SC
PA3331	Citocromo P450	SC	SC	-27	SC
PA3333	<i>fabH2</i> , Proteína 3-oxoacyl-(acyl-carrier)	SC	SC	-9	SC
PA3392	<i>nosZ</i> , Óxido nítrico reductasa	SC	SC	11	SC
PA3877	<i>nark1</i> , Proteína asimilación de nitrato	-11	SC	SC	-3.4
PA3915	<i>moaB1</i> , Proteína de la síntesis de molibdenopterina	-22	SC	SC	SC
PA4175	<i>prpL</i> , Endoproteasa regulada por PvdS, lítica	-3.8	SC	SC	-2.7
PA4205	<i>mexG</i> , Proteína componente bomba de expulsión	-87	-8.9	SC	SC
PA4206	<i>mexH</i> , Proteína componente bomba de expulsión	-42	-6.5	SC	SC
PA4207	<i>mexI</i> , Proteína componente bomba de expulsión	-25	-7.4	SC	SC
PA4208	<i>opmD</i> , Proteína bomba de expulsión	-13	-6	SC	SC
PA4211	<i>phzB2</i> , Proteína biosíntesis fenazinas	-13	SC	-60	SC
PA4876	<i>osmE</i> , Proteína inducida por diferencias de osmolaridad	-2.6	SC	SC	SC
PA5058	<i>phaC2</i> , Poli(3-hydroxialcanoic acid) sintetasa 2	-2.6	SC	SC	SC

**Tabla 4.4. Resumen de los genes que presentan una expresión diferencial en las cepas PT149 y PT637 que pertenecen al regulón de *quorum sensing*.** En rojo los genes que disminuyen su expresión y en azul los que aumentan (el análisis completo se recoge en la tabla 2 del anexo 1).

#### 4.3.3 Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de los resultados obtenidos en los ensayos de transcriptómica

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de transcriptómica la expresión de algunos genes fue cuantificada mediante RT-PCR en tiempo real. Los primeros genes que se evaluaron fueron los correspondientes a la bomba MexEF-OprN. Como se observa en la figura 4.3 los niveles de expresión de MexE y MexF son mucho mayores en la cepa PT149 al compararlo con la cepa silvestre, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria, lo que confirma los resultados obtenidos en los estudios de transcriptómica.

Para analizar si la sobre-expresión de MexEF-OprN afecta la expresión de otras bombas tipo RND en *P. aeruginosa*, se midió la expresión de MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY. La figura 4.3 muestra que la expresión de estas bombas no presentó cambios en la cepa PT149, lo que sugiere que la sobre-producción de MexEF-OprN no activa el funcionamiento de estas bombas. Estos resultados

corroboran los datos obtenidos en el análisis del transcriptoma donde, aparte de MexEF-OprN, sólo la bomba MexGHI-OpmD varía su expresión en la cepa PT149 (Tabla 4.5).

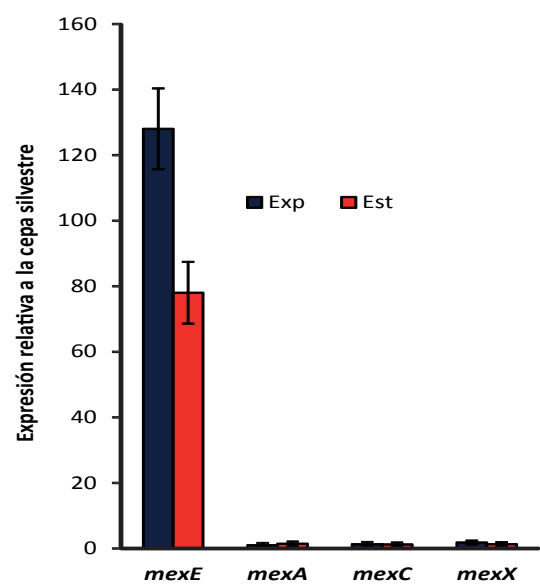
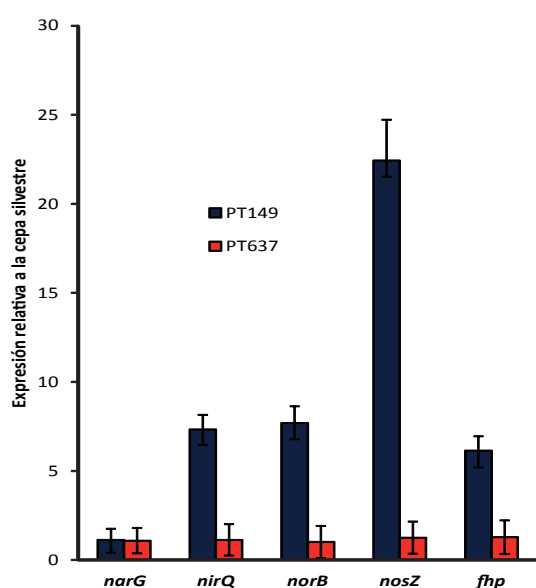


Figura 4.3. Análisis de la expresión de otras bombas RND de *P. aeruginosa* mediante de RT-PCR en tiempo real en la cepa PT149 tanto en fase logarítmica (Azul) como en fase estacionaria (Rojo) de crecimiento. La sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN no activa la expresión de las bombas MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY.

Gen	Expresión relativa a la cepa silvestre	
	Fase Exponencial	Fase Estacionaria
mexA (PA0425)	1.13	-1.17
mexB (PA0426)	-1.14	-1.22
mexE (PA2493)	55.54	55.73
mexF (PA2494)	94.07	68.48
mexG (PA4205)	1.23	-86.9
mexH (PA4206)	-1.08	-41.82
mexI (PA4207)	-1.01	-24.9
mexC (PA4599)	1.12	-1.09
mexD (PA4598)	-1	1.03
mexX (PA2018)	-1.16	-1.11
mexY (PA2019)	-1.02	1.13
mexJ (PA3677)	-1.33	-1.24
mexK (PA3676)	-1.34	-1.28
mexV (PA4374)	-1.15	1.19
mexW (PA4375)	1.04	1.05
triA (PA0156)	1.02	-1.27
triB (PA0157)	1.08	-1.12
triC (PA0158)	-1.17	-1.17
amrA (PA1435)	-1.03	-1.13
amrB (PA1436)	1.05	-1.1
czcA (PA2520)	1.04	-1.05
czcB (PA2521)	1.05	1.04
yegM (PA2528)	-1.03	1.05
yegN (PA2527)	-1.2	1.11
yegO (PA2526)	1.06	-1.07
mexP (PA3523)	-1.17	1.15
mexQ (PA3522)	1.19	1.17

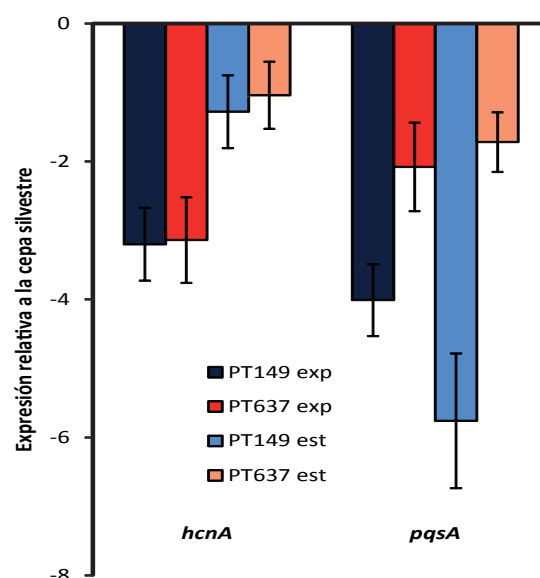
Tabla 4.5. Expresión diferencial de todas las bombas de la familia RND presentes *P. aeruginosa* en la cepa PT149. Con excepción de MexGHI-OpmD todas las demás bombas de la familia RND presentan niveles de expresión similares a los de la cepa silvestre.

En el mismo análisis encontramos que en la cepa PT149 algunos genes de la cadena respiratoria de nitrato se encontraban sobre-expresados en fase exponencial. La figura 4.4 muestra que todos los operones involucrados en esta cadena respiratoria (*nir*, *nor* y *nos*) con excepción del operón *nar*, aumentan su expresión en la cepa PT149, mientras que en la cepa PT637 no se evidencia ninguna variación. También observamos que el gen *fhp*, que codifica la flavo-hemo-proteína encargada de la desintoxicación de óxido nítrico en condiciones aeróbicas, está sobre-expresado en PT149 pero no en PT637 (Figura 4.4). Estos resultados indican que el aumento de expresión de los genes de la cadena respiratoria de nitrato podría estar relacionado con la sobre-expresión de MexEF-OprN, independientemente de la acción de MexT.



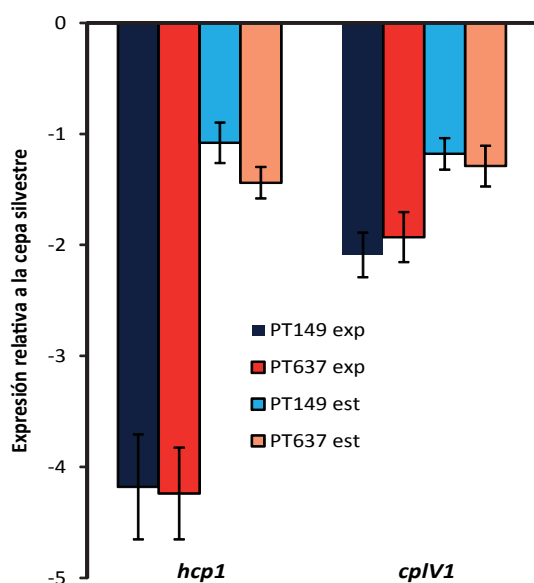
**Figura 4.4. Determinación de la expresión de los genes de la cadena respiratoria de nitrato mediante RT-PCR en tiempo real en las cepas PT149 y PT637.** El aumento de la expresión de los genes involucrados en esta cadena respiratoria se debe a la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN independientemente de la acción de MexT.

La expresión de los genes del operón *pqsABCDE* disminuye en fase exponencial en PT149 y en menor medida en PT637. Además en fase estacionaria sólo se ve disminuida la expresión de estos mismos genes en PT149 (Figura 4.5). Por otra parte el operón *hcnABC* disminuye su expresión en PT149 solamente en fase exponencial ya que en fase estacionaria no se aprecia ningún cambio.



**Figura 4.5. Verificación de la expresión de los genes *hcnA* y *pqsA*.** Mediante RT-PCR en tiempo real se confirmaron los niveles de expresión de los genes *hcnA* y *pqsA* en las cepas PT149 y PT637 tanto en fase logarítmica (exp) como estacionaria (est) de crecimiento.

Algunos elementos del SST6 también presentaron niveles menores de expresión respecto a la cepa PT5 en las cepas PT149 y PT637. En la figura 4.6 podemos apreciar que los genes *hcp1* y *cpIV1* disminuyen su expresión en estas dos cepas, solamente durante la fase logarítmica. Estos resultados sugieren que MexT podría estar regulando los componentes de este sistema de secreción independientemente de la acción de MexEF-OprN.



**Figura 4.6. Evaluación de la expresión de los genes del SST6.** Elementos del SST6 disminuyen su expresión tanto en PT149 como en PT637 en fase logarítmica (exp), mientras que en fase estacionaria (est) los niveles se acercan a los de la cepa silvestre.

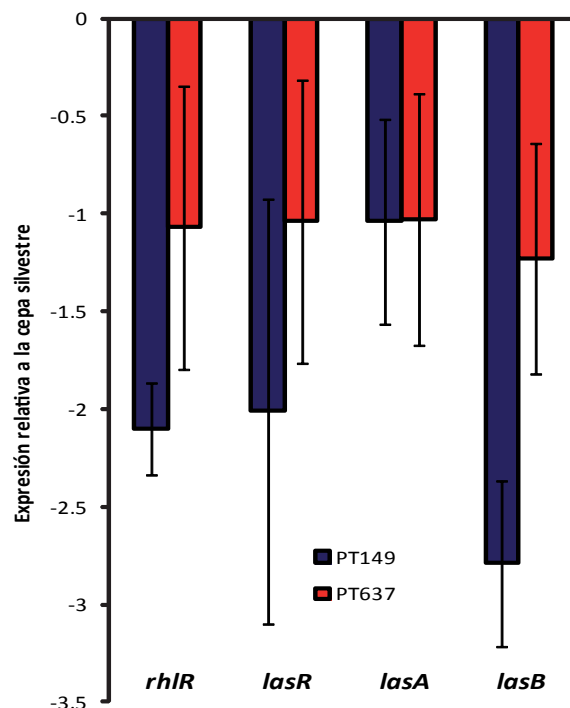
Publicaciones anteriores han demostrado que *rhIR* y *lasR* presentan niveles de expresión menores en un mutante que sobre-expresa MexEF-OprN (Linares y cols., 2005). En nuestro análisis del transcriptoma ambos genes no pasaron el filtro de selección, por el contrario, utilizando RT-PCR en tiempo real *rhIR* presenta una pequeña disminución en su expresión (Figura 4.7). Por otra parte, *lasR* presenta cambios de expresión que no son estadísticamente significativos, razón por la cual no podemos afirmar que este gen disminuye su expresión. Uno de los componentes de virulencia regulados por la cascada de reacciones de *rhIR* es la elastasa. Los genes involucrados en la producción de la elastasa *lasA* y *lasB* no presentan cambios en el análisis del transcriptoma, no obstante mediante RT-PCR en tiempo real se demostró que la expresión de *lasB* disminuye aproximadamente tres veces en fase estacionaria, mientras que *lasA* no presentó variaciones significativas (Figura 4.7).

Encontramos además, que en fase estacionaria los operones que codifican la bomba MexGHI-OpmD y uno de los operones que participan en la síntesis de fenazinas -*phzABCDEFG2*- disminuyeron su expresión en PT149 sin variar en PT637 (Figura 4.8). En la presente tesis doctoral estos genes fueron utilizados como marcadores de los cambios en *quorum sensing*.

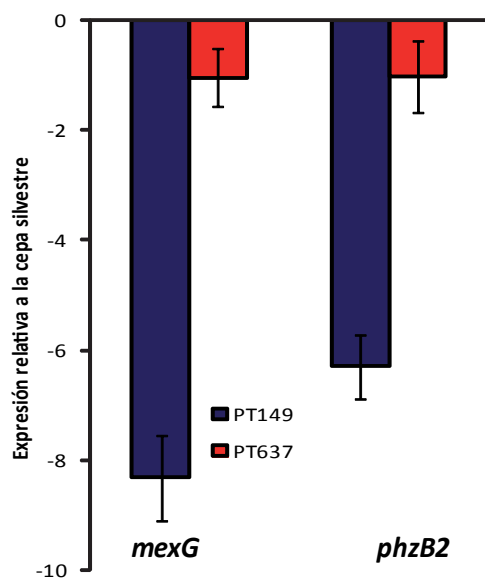
## 4.4 Efectos de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre *quorum sensing*

### 4.4.1 Variación de los factores de virulencia

La piocianina es un factor de virulencia de *P. aeruginosa* regulado por *quorum sensing*. Su color es azul y tiene actividad óxido-reductora, de modo que cuando es reducida por NAD(P)H reacciona con el oxígeno molecular produciendo ión superóxido y peróxido de hidrógeno. La producción de estas especies reactivas de oxígeno ayuda a la bacteria a contrarrestar la acción de los macrófagos (Muller,



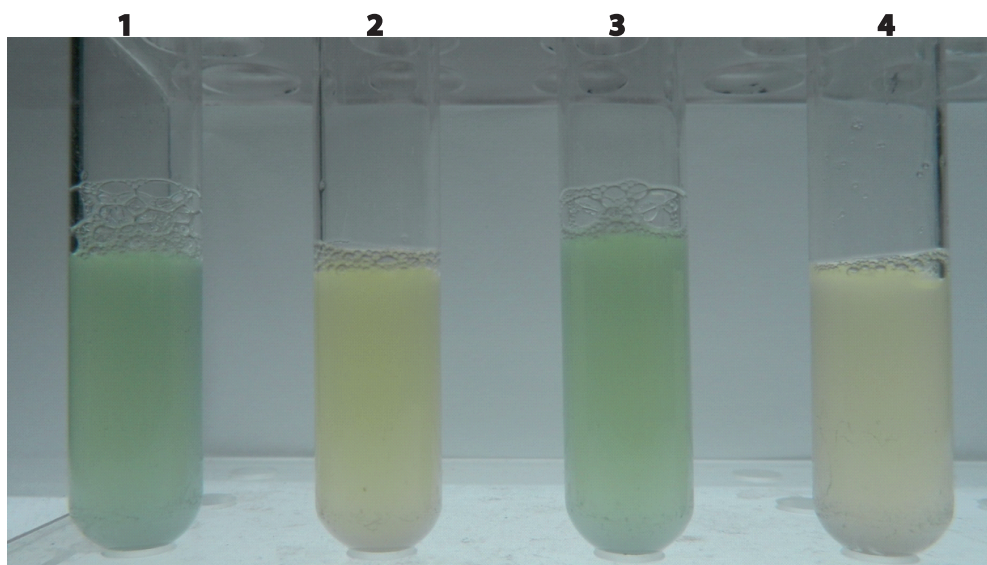
**Figura 4.7. Evaluación de la expresión de genes involucrados en *quorum sensing* en fase estacionaria de crecimiento.** Mediante RT-PCR se determinó la expresión de genes involucrados en *quorum sensing*. Sólo el regulador *rhIR* disminuye su expresión en la cepa PT149 mientras que *lasR* mantiene niveles de expresión similares a los de la cepa silvestre. De la misma manera sólo el gen *lasB* de la vía de síntesis de la elastasa (regulada por RhIR), disminuye su expresión en la cepa PT149. Los niveles de expresión de estos genes en la cepa PT637 son similares a los de la cepa silvestre.



**Figura 4.8. Estimación de la expresión de genes marcadores del regulón de *quorum sensing*.** Los genes *mexG* y *phzB2*, utilizados como marcadores en este trabajo, disminuyen su expresión en la cepa PT149 en fase estacionaria de crecimiento, mientras que en la cepa PT637 no se aprecian cambios. Esto indica que este efecto es independiente de la acción del regulador *MexT*.

La deficiencia de pigmentos es apreciable a simple vista en la cepa PT149 (Figura 4.9). De acuerdo con esta observación, PT149 produce un 19,7% de la piocianina que produce PT5. Por otra parte, la cepa PT637 también presenta una deficiencia en la producción de pigmentos; 83,94% del total producido por la estirpe silvestre (Tabla 4.6), lo que sugiere que *MexT* también podría influir en la

expresión de los genes involucrados en la producción de piocianina de modo independiente a MexEF-OprN.



**Figura 4.9. Producción de pigmentos en los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN.** En la figura se muestran las diferentes cepas **(1)** PT5, **(2)** PT149, **(3)** PT364 y **(4)** PT637, crecidas en medio LB después de 18 horas de cultivo. Las cepas PT149 y PT637 producen menor cantidad de pigmentos que la cepa silvestre (PT5) y la cepa PT364.

Otro factor de virulencia producido por *P. aeruginosa* son las exoproteasas, tales como la elastasa y la caseinasa. Estas proteínas son las responsables de los daños en las paredes bronquiales y en los parénquimas pulmonares de los pacientes con fibrosis quística (Galloway, 1991). Su expresión se ve también disminuida en la cepa PT149, no así en PT637 (Tabla 4.6) lo que sugiere que su expresión depende exclusivamente de componentes de *quorum sensing*.

La hemolisina, factor de virulencia relevante en la colonización celular presentó un comportamiento similar a la elastasa ya que su producción disminuye solamente en el mutante que sobre-expresa el sistema MexEF-OprN (Tabla 4.6).

% respecto a PT5 en Medio LB				
Cepa	Piocianina	Caseinasa	Elastasa	Hemolisina
PT5	100	100	100	100
PT149	22,4 ± 4	16,7 ± 3	4,3 ± 3	49,8 ± 5
PT637	75,3 ± 6	98,4 ± 4	95,7 ± 4	99,4 ± 7

**Tabla 4.6. Análisis de la producción de factores de virulencia regulados por *quorum sensing*.** De acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, se evaluó la producción de piocianina, caseinasa, elastasa y hemolisina en los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN.

#### 4.4.2 Alteración de la producción de PQS y HHQ en la cepa PT149

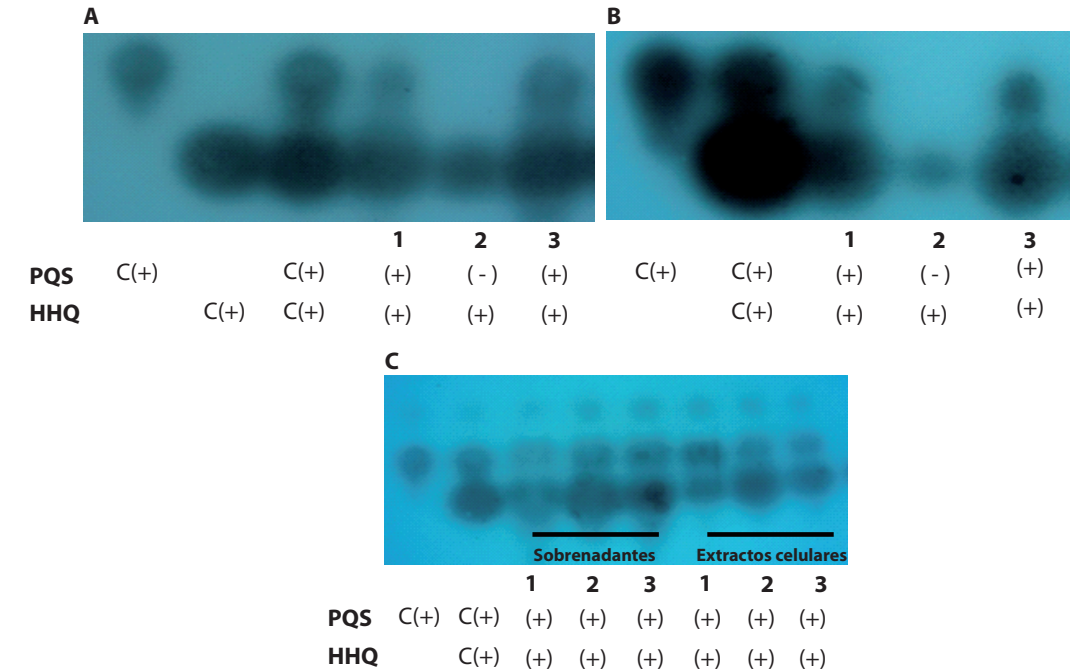
Una baja concentración intracelular de PQS podría generar deficiencias de *quorum sensing* en la cepa PT149 (Kohler y cols., 1997; Kohler y cols., 2001). Con el fin de analizar esta hipótesis se extrajo tanto PQS como su precursor HHQ a partir de las cepas PT149 y PT637. Para determinar la presencia de



ambos compuestos se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina, TLC (por sus siglas en inglés). En este experimento utilizamos a la cepa PT637 como control para descartar que este fenómeno pudiese tener cualquier relación con la activación de MexT. La señal fue extraída desde el sobrenadante como del sedimento de células. La figura 4.10AB muestra que no se encuentra PQS en el sobrenadante, así como tampoco en el extracto celular de PT149 en tiempos tempranos de la fase estacionaria ( $DO_{600} \sim 2,0$ ). Por el contrario, en la cepa PT637 se evidencia la presencia de esta molécula. Esto nos confirma que la ausencia de PQS en la cepa PT149 se debe a la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN, independientemente de la actividad reguladora de MexT sobre otros genes.

Respecto a HHQ, encontramos que esta molécula está presente tanto en el sobrenadante como en el sedimento celular durante tiempos tempranos de la fase estacionaria en el mutante PT149 (Figura 4.10AB). Si bien el método utilizado sólo es semi-cuantitativo, sí se puede apreciar una mancha de menor intensidad en el extracto celular en la cepa PT149 al compararla con las cepas PT5 y PT637. Esto sugiere que HHQ se encuentra en baja cantidad en el interior de la célula y a su vez, haría presumir que es este compuesto o un precursor del mismo, el que está siendo expulsado por la bomba. Es necesario mencionar que la intensidad de la mancha correspondiente a HHQ detectada en el sobrenadante fue similar para todas las cepas comparadas.

Por otra parte, también se analizó si la ausencia de PQS se mantenía a lo largo del tiempo. La figura 4.10C muestra que en fase estacionaria tardía (aproximadamente 14 horas desde el inicio del cultivo) volvía a aparecer PQS tanto en el sobrenadante como en el sedimento de células en la cepa PT149. Estos resultados indican que sólo existe un retraso en la producción de PQS.



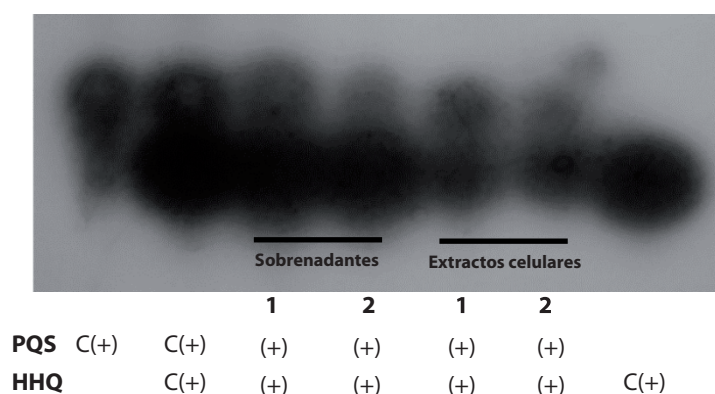


#### 4.4.2.1 Restablecimiento de la producción de PQS en la cepa PT149 en presencia de antranilato

Los resultados anteriores muestran que la cepa PT149 no está produciendo PQS en fase estacionaria temprana. Esta ausencia podría tener su origen en la falta de alguna de las moléculas precursoras que participan en su síntesis. Además, hemos observado que en la cepa PT149 los niveles de HHQ son menores en el extracto celular, esto puede ser debido a la disminución de alguna molécula intermediaria de la síntesis de antranilato (Figura 1.6). HHQ se forma a partir de la condensación de antranilato con un  $\beta$ -cetoácido graso (Cornforth y James, 1956), razón por la cual el antranilato es fundamental para la producción de PQS.

Para determinar si la ausencia de PQS se debe a un déficit de antranilato, se agregó 1 mM de este compuesto al medio LB. Esta adición permitió la recuperación de la producción de PQS en la cepa PT149 durante tiempos tempranos de la fase estacionaria (Figura 4.11). Por otra parte, también aumentó la cantidad de HHQ lo que podría indicar que es el antranilato la molécula que disminuye su concentración en el interior de la célula debido a la sobre-expresión de MexEF-OprN.

A pesar de que la adición de antranilato permite recuperar los niveles de HHQ, no podemos afirmar que es ésta la molécula que está siendo expulsada por la bomba.



Resultados

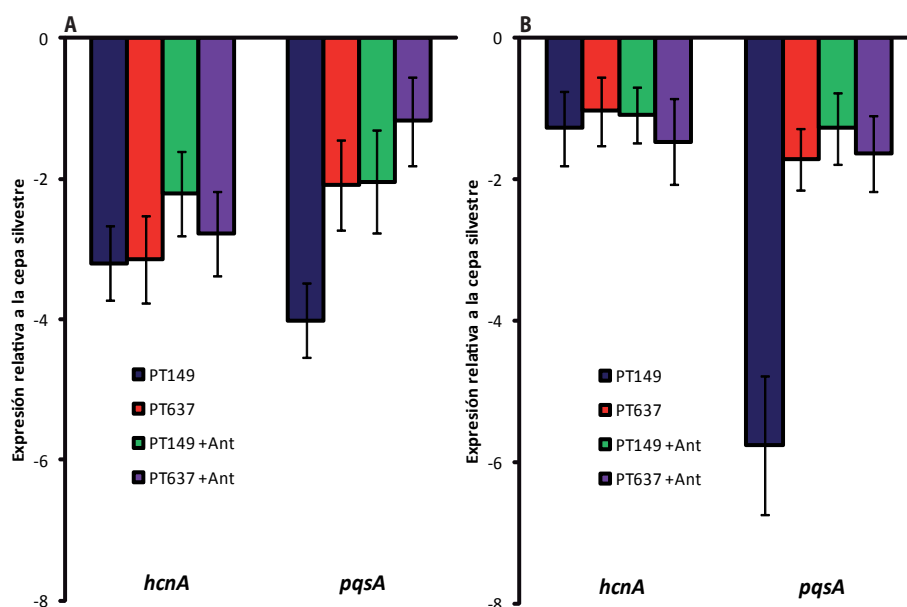
**Figura 4.11. Efecto de la adición de antranilato en la producción de PQS y HHQ.** Mediante TLC se determinó la presencia de PQS y HHQ en fase estacionaria temprana en las cepas PT5 (**carril 1**) y PT149 (**carril 2**) crecidas en medio LB con 1 mM de antranilato tanto en el sobrenadante como en el extracto celular. Se utilizaron las moléculas PQS y PQS + HHQ como control positivo del experimento (C(+)).

#### 4.4.2.2 Recuperación de la expresión de los genes del regulón de *quorum sensing* en presencia de antranilato

La restauración de la producción de HHQ y PQS mediante la adición de antranilato al medio, debería restablecer la expresión de aquellos genes que presentaron una disminución en los niveles de expresión en la cepa PT149. Para analizar esta hipótesis se midió la expresión de dichos genes tanto en fase exponencial ( $DO_{600}$  0,6) como en fase estacionaria temprana ( $DO_{600}$  2,0) y los resultados se compararon con aquellos obtenidos en medio LB sin antranilato. En la Figura 4.12 se puede observar que los genes de los operones *hcnABC* y *pqsABCDE* aumentan su expresión con la adición de antranilato tanto en fase exponencial como en fase estacionaria, aunque no se logran restablecer por completo los niveles de expresión de la cepa silvestre.

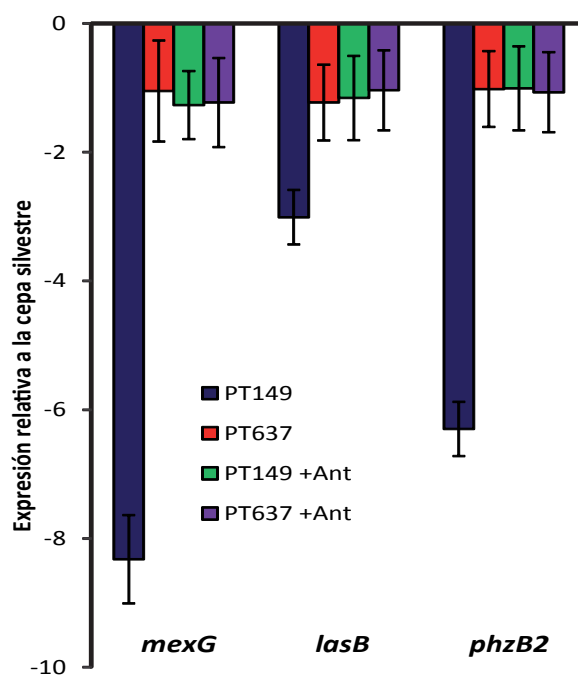
Los efectos de la adición de antranilato se harían más evidentes durante la fase estacionaria ya que es en esta etapa de crecimiento donde los genes involucrados en *quorum sensing* activan su expresión. Para analizar esta posibilidad se midió la expresión de los genes utilizados como marcadores

de *quorum sensing* en este trabajo (*MexGHI-OpmD*, *phzABCDEFG2* y *lasB*). Encontramos que tanto *MexGHI-OpmD*, el operón *phzABCDEFG2* y *lasB* recuperan totalmente la expresión en medio LB con 1 mM de antranilato, alcanzando los niveles de la cepa silvestre (Figura 4.13).



**Figura 4.12 Efecto de la adición de antranilato en las cepas PT149 y PT637.** Mediante RT-PCR en tiempo real se determinaron los niveles de expresión de los genes *hcnA* y *pqsA* en presencia de 1 mM de antranilato tanto en fase exponencial (A) como en fase estacionaria (B). Con la adición de este compuesto la cepa PT149 recupera niveles de expresión similares a la cepa silvestre. No se observaron cambios en la cepa PT637.

## Resultados



**Figura 4.13. Efecto de la adición de antranilato en los genes marcadores del regulón de *quorum sensing*.** Se evaluó la expresión de los genes *mexG*, *lasB* y *phzB2*, mediante RT-PCR en tiempo real, en las cepas PT149 y PT637 crecidas en medio LB con 1 mM de antranilato en fase estacionaria de crecimiento. La adición de este compuesto permite la recuperación de los niveles de expresión en la cepa PT149.

Además de la recuperación de la expresión de los genes mencionados anteriormente, también se observó que los componentes de virulencia mediados por *quorum sensing* alcanzan niveles cercanos a los de la cepa silvestre cuando se añade antranilato al medio (Tabla 4.7). Si bien existe un aumento en la producción de estos componentes, sólo la hemolisina recupera los niveles de la cepa silvestre. Estos resultados indican que la adición de antranilato permite recuperar el fenotipo perdido por la cepa PT149 debido a la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN.

% respecto a PT5 en Medio LB				
Cepa + condición	Piocianina	Caseinasa	Elastasa	Hemolisina
PT5	100	100	100	100
PT5 + Antranilato (1mM)	104,6 ± 7	102,3 ± 6	100,4 ± 3	101,7 ± 5
PT149 + Antranilato (1mM)	88,6 ± 4	74,3 ± 2	69,8 ± 2	97,6 ± 4
PT637 + Antranilato (1mM)	98,7 ± 2	96,4 ± 4	98,5 ± 2	96,7 ± 5

**Tabla 4.7. Producción de factores de virulencia regulados por *quorum sensing* en presencia de antranilato.** Para determinar si la adición de antranilato permitía recuperar la producción de piocianina, caseinasa, elastasa y hemolisina, se crecieron las cepas PT5, PT149 y PT637 en presencia de este compuesto.

#### 4.4.2.3 Análisis de la velocidad de crecimiento de la cepa PT149 utilizando intermediarios de la síntesis de HHQ y PQS como únicas fuentes de carbono

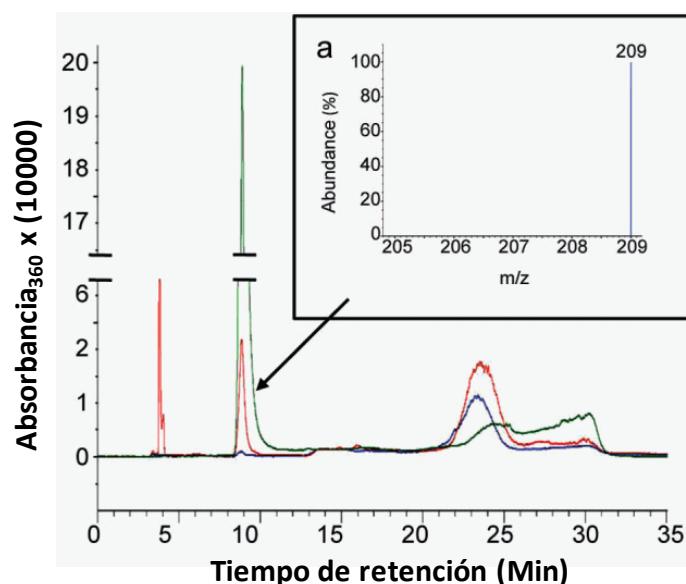
La principal vía de síntesis de antranilato en medio LB es la vía de degradación del triptófano (Farrow y Pesci, 2007) (Figura 1.6). En base a los datos del apartado anterior se puede inferir que el antranilato o cualquiera de los intermediarios que participan en su síntesis (kinurenina y formil-kinurenina), son los candidatos más probables para ser expulsados por MexEF-OprN.

Para determinar cuál de estos compuestos está siendo expulsado por la bomba, se procedió a utilizar de forma individual antranilato, L-kinurenina y triptófano como única fuente de carbono. La L-formil-kinurenina no pudo ser empleada debido a que no se encuentra disponible a nivel comercial. Lo esperable es que aquel medio que contiene como fuente carbono el compuesto que va a ser expulsado, sea el que presente más problemas para que PT149 crezca normalmente. Como se muestra en la tabla 4.8 el tiempo de duplicación no varió entre PT149, PT637 y la cepa silvestre (PT5) cuando se usó antranilato como única fuente de carbono. Por otra parte, utilizando L-kinurenina la cepa PT149 presentó una velocidad de crecimiento menor respecto a las otras dos cepas. El mismo efecto se aprecia cuando usamos triptófano. Estos resultados indican que alguno de estos precursores (L-kinurenina, L-formil-kinurenina o triptófano) está siendo expulsado por la bomba MexEF-OprN ya que no lo puede usar eficientemente como fuente de carbono.

Tiempo de Duplicación (min)			
Medio Utilizado	PT5	PT149	PT637
M63 + Antranilato (10 mM)	124 ± 30	138 ± 14	154 ± 16
M63 + L-triptófano (10 mM)	277 ± 16	876 ± 276	364 ± 65
M63 + L- kinurenina (10 mM)	325 ± 5	453 ± 16	345 ± 23

**Tabla 4.8. Determinación del tiempo de duplicación utilizando los intermediarios de la síntesis de PQS como única fuente de carbono.** Se crecieron las cepas PT5, PT149 y PT637 en medio M63 con antranilato, L-triptófano y L-kinurenina. Los valores mostrados son el resultado de la media de tres experimentos diferentes.

Con el fin de establecer la molécula que está siendo expulsada por MexEF-OprN se midió por HPLC y espectrometría de masas la presencia de estos componentes en los sobrenadantes de cultivo de las cepas silvestre, PT149 y PT637, crecidas en medio con triptófano, como única fuente de carbono. Encontramos que la L-kinurenina es el compuesto que aparece en los sobrenadantes de la cepa PT149 y está ausente tanto en la cepa silvestre (PT5) como en la PT637 (Figura 4.14). Esto confirma que es la L-kinurenina la molécula que está siendo expulsada por la bomba.



**Figura 4.14. Determinación del intermediario de la síntesis de PQS expulsado por MexEF-OprN.** Mediante HPLC y posterior espectrometría de masas se determinó que la L-kinurenina es el compuesto expulsado por la bomba MexEF-OprN.

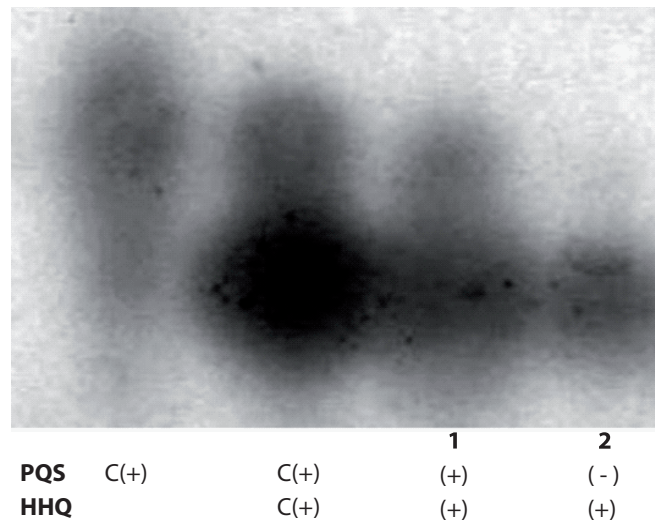
#### 4.4.2.4 La sobre-expresión de *kynB* restablece la producción de PQS y los niveles de expresión de los genes de *quorum sensing*

KynA y KynB son las enzimas que participan directamente en la síntesis de los intermediarios del antranilato, formil-kinurenina y L-kinurenina respectivamente (Figura 1.6). Para determinar si se recupera la producción de PQS cuando estos genes son sobre-expresados, se clonaron en forma individual y se introdujeron en las cepas silvestre (PT5), PT149 y PT637. La presencia de PQS fue analizada mediante TLC.

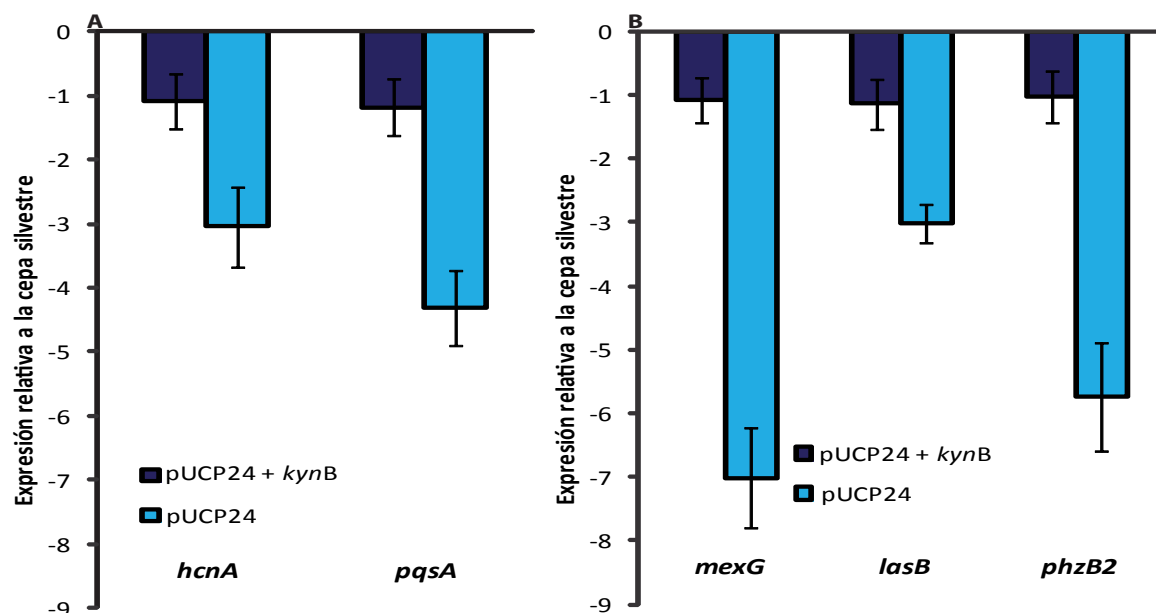
La sobre-expresión de *kynB* permite recuperar la producción de PQS en PT149 (Figura 4.15). Este hecho hace suponer que la formil-kinurenina no se encuentra en concentración limitante en el interior celular y es la L-kinurenina la que está siendo expulsada por la bomba MexEF-OprN, lo que confirma los resultados obtenidos por HPLC y espectrometría de masas.

Por otra parte, si la sobre-expresión de *kynB* puede restaurar la producción de PQS en la cepa PT149, también debería restablecer la expresión de los genes que presentan disminuida su expresión en dicha cepa. Para comprobar esta hipótesis se extrajo ARN del mutante complementado con el gen *kynB* y mediante RT-PCR en tiempo real se comparó la expresión con la cepa que contiene el plásmido vacío. En la figura 4.16A se puede apreciar que los operones *hcnABC* y *pqsABCDE*, que presentan niveles de expresión menores en fase logarítmica, recuperan niveles de expresión similares a los de la cepa silvestre cuando *kynB* se sobre-expresa. Resultados similares se obtuvieron para los

genes marcadores del regulón de *quorum sensing* (*mexGHI-OpmD*, *phzABCDEFG2* y *lasB*). Si bien *mexGHI-OpmD* y *phzABCDEFG2* aumentaron sus niveles de expresión, estos no alcanzaron los valores determinados para la cepa silvestre. En lo que respecta a *lasB* la sobre-producción de KynB restaura su expresión a niveles similares a los presentados por la cepa silvestre (Figura 4.16B).



**Figura 4.15 Efecto de la sobre-expresión de *kynB* en la producción de PQS y HHQ.** La expresión de *kynB* desde un plásmido permite recuperar la producción de PQS y HHQ en la cepa PT149 en fase estacionaria temprana. Carril 1: PT149 + pUCKynB; Carril 2: PT149 + pUCP24 (plásmido vacío). Se utilizaron las moléculas PQS y PQS + HHQ como control positivo del experimento (C(+)).

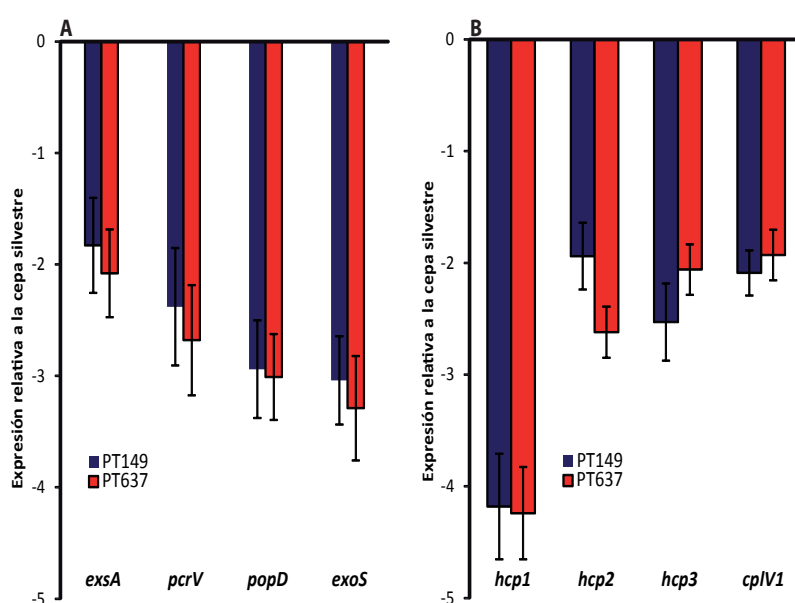


**Figura 4.16. Efecto de la sobre-expresión de *kynB* en la cepa PT149.** El gen *kynB* fue clonado y sobre-expresado en el plásmido pUCP24. Mediante RT-PCR en tiempo real se evaluó la expresión de los genes que disminuyen su expresión en fase logarítmica (A) y en fase estacionaria (B). En ambas fases la sobre-expresión de este gen recupera niveles de expresión similares a los de la cepa silvestre.

## 4.5 Efectos de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre la virulencia de *P. aeruginosa*

### 4.5.1 MexT regula la secreción de proteínas en *P. aeruginosa* en forma independiente de MexEF-OprN

Como se cita en la introducción, la sobre-expresión del sistema MexEF-OprN está asociada con una reducción en la expresión de los componentes del Sistema de Secreción Tipo III (SST3) de *P. aeruginosa* (Linares y cols., 2005). Trabajos recientes han demostrado que MexT está involucrado en la disminución de la expresión de SST3 (Tian y cols., 2009a; Tian y cols., 2009b). Posteriormente, Jin, y cols. (2011) confirmó la acción reguladora de MexT sobre el SST3; la cual estaría mediada por MexS y PtrC. En la presente tesis doctoral encontramos que tanto el gen que codifica la proteína efectora ExoS, como los genes que codifican las proteínas estructurales PcrV y PopD y la proteína reguladora del sistema ExsA, presentan niveles de expresión menores en las cepas PT149 y PT637 bajo condiciones de inducción del SST3 (Figura 4.17A). Estos resultados sugieren que MexT regula la expresión del SST3 de forma independiente a la bomba MexEF-OprN.

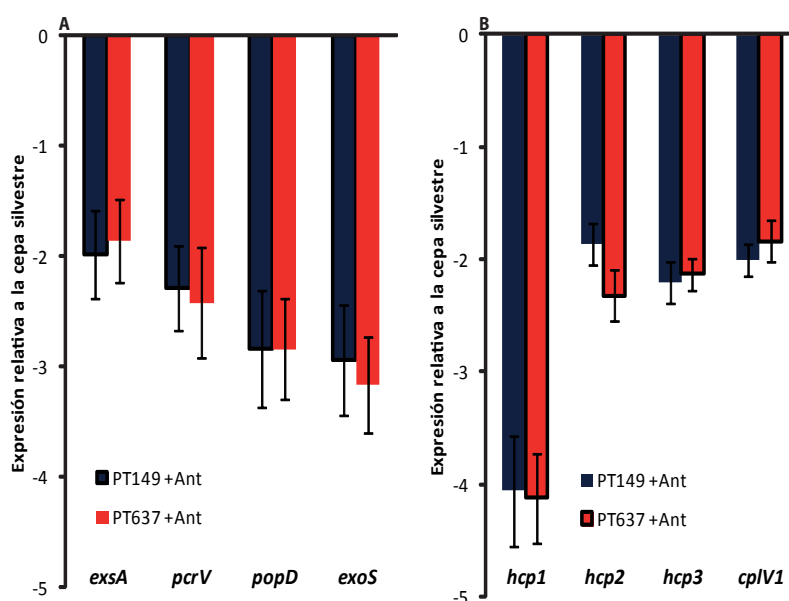


**Figura 4.17. Evaluación de la expresión de los genes del SST3 y del SST6.** Mediante RT-PCR en tiempo real se midió la expresión de elementos del SST3 (A) y SST6 (B) en las cepas PT149 y PT637. En ambos mutantes se aprecia una disminución en la expresión de estos sistemas de virulencia lo que indica que su regulación podría depender de MexT.

Además del SST3, en nuestro análisis transcriptómico encontramos que algunos componentes del SST6 presentaban niveles de expresión menores a los de la cepa silvestre en las cepas PT149 y PT637. El genoma de *P. aeruginosa* posee 3 copias de este sistema localizado en diferentes loci del cromosoma, cuya regulación es diferencial (Mougous y cols., 2006). En el análisis del transcriptoma encontramos que sólo las proteínas Hcp1 y ClpV1 del SST6 varían su expresión. Con el fin de validar estos datos y a su vez, analizar el comportamiento de las otras copias de estas proteínas se midió la expresión de *hcp1*, *hcp2*, *hcp3* y *clpV1* mediante RT-PCR en tiempo real en fase logarítmica de crecimiento. Los resultados confirmaron que la expresión de estos genes es menor en las cepas PT149

y PT637 respecto a la cepa silvestre (Figura 4.17B), lo que indica que el SST6 podría estar regulado directa o indirectamente por MexT.

Con el fin de descartar la posibilidad de que los elementos de *quorum sensing* puedan regular la expresión de estos sistemas de secreción se midió su expresión en cultivos suplementados con antranilato. En ningún caso se recuperó la expresión de los genes que habían disminuido en la cepa PT149 (Figura 4.18). Estos datos reafirman la posibilidad de que la regulación de estos dos sistemas de secreción sea independiente del funcionamiento de la bomba.



**Figura 4.18. Efecto de la adición de antranilato sobre los niveles de expresión de los SST3 y SST6.** Con el fin de demostrar que la disminución de la expresión de los SST3 (A) y SST6 (B) es independiente del sistema de *quorum sensing*, las cepas PT149 y PT637 fueron crecidas en medio LB con 1 mM de antranilato. Como se aprecia en la figura la adición de antranilato no recupera los niveles de expresión presentados por la cepa silvestre

#### 4.5.2 Cambios en la virulencia sobre *C. elegans*

Se ha descrito que el nematodo *C. elegans* es un buen modelo para estudiar la virulencia de diferentes bacterias patógenas, entre ellas *P. aeruginosa* (Aballay y Ausubel, 2002). Una de las características fundamentales de este modelo es que la bacteria utiliza los mismos factores de virulencia tanto para matar al nematodo como en los procesos infectivos en mamíferos (Tan y cols., 1999a).

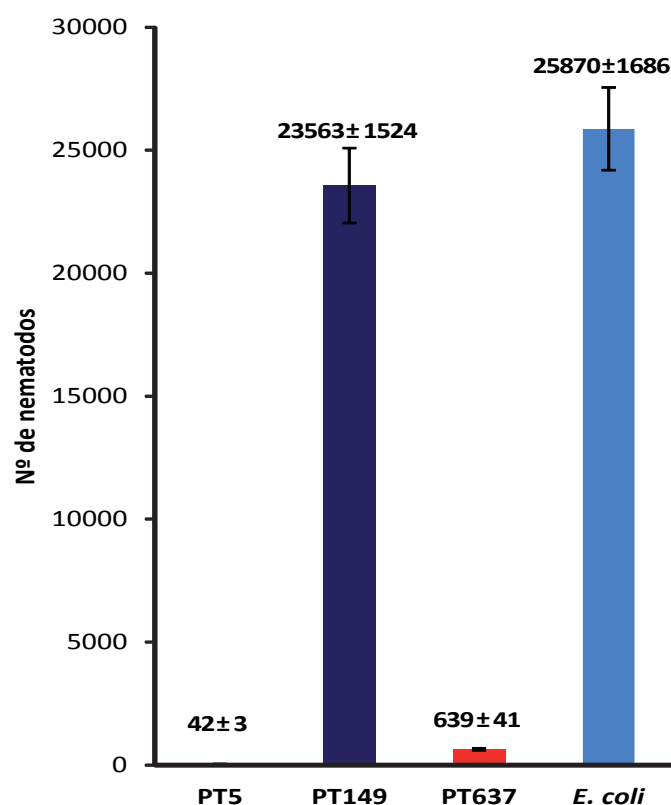
*P. aeruginosa* produce la muerte del nematodo mediante dos mecanismos. Estos mecanismos se han denominado “muerte rápida” (Darby y cols., 1999; Gallagher y Manoil, 2001) y “muerte lenta” (Tan y cols., 1999a; Tan y cols., 1999b). La “muerte rápida” consiste en un fenómeno denominado parálisis letal el cual es provocado por la producción de ácido cianhídrico (regulado por *quorum sensing*). Este tipo de muerte parece estar asociada al crecimiento de la bacteria en medios ricos (p.e. BHI o LB) y con elevada osmolaridad (Aballay y Ausubel, 2002). Por otra parte, la “muerte lenta” se debe a la proliferación de la bacteria en el intestino del nematodo (Tan y cols., 1999b) pero se desconocen los motivos exactos por los cuales se produce esta muerte.

Investigaciones previas han demostrado que el mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-



OprN es menos virulento que la cepa silvestre en el modelo de *Dictyostelium discoideum* (Cosson y cols., 2002; Linares y cols., 2005), no obstante, todavía no son claras las causas de esta pérdida de virulencia. Los principales componentes de virulencia en *P. aeruginosa* hasta ahora descritos, son el SST3 y factores de virulencia regulados por *quorum sensing*. Ambos componentes se ven afectados ya sea por MexT o por la sobre-expresión de MexEF-OprN respectivamente, por consiguiente la virulencia debería ser menor. Con el fin de analizar el efecto sobre la virulencia de *P. aeruginosa* de los distintos componentes del sistema MexT-MexEF-OprN, probamos nuestros mutantes en el modelo de virulencia de *C. elegans* (Aballay y Ausubel, 2002; Mahajan-Miklos y cols., 1999; Tan y cols., 1999a; Tan y cols., 1999b). A diferencia de los modelos propuestos basados en curvas de mortalidad (Tan y cols., 1999a), en nuestro laboratorio usamos un modelo basado en la capacidad de multiplicación del nematodo (Navas y cols., 2007; Sanchez y cols., 2002a). En la figura 4.19 podemos observar que la cepa PT149 es menos virulenta en este modelo. Por otra parte, el mutante PT637 disminuye en parte su virulencia, aunque no es avirulento como PT149. Como se pudo apreciar en resultados anteriores, PT637 presenta una disminución en la expresión de los SST3 y SST6 lo que sugiere que la pérdida de virulencia utilizando el modelo de *C. elegans* está relacionada principalmente con la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN, siendo menor la contribución del efecto regulador de MexT sobre otros genes.

## Resultados



**Figura 4.19. Efecto de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre la virulencia de *P. aeruginosa* en el modelo de *C. elegans*.** Cinco hembras de *C. elegans* fueron colocadas sobre un césped de bacterias crecidas en agar PDA. Trascurridos 7 días se contó el número de nematodos por placa. La figura muestra que la cepa PT149, que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN, disminuye su virulencia favoreciendo el aumento de la población del nematodo en los cultivos. PT637 mantiene niveles de virulencia similares a PT5 (cepa silvestre), aunque permite que un mayor número de nematodos crezca en la placa. La cepa OP50 de *E. coli* se utilizó como control del experimento. Estos valores son la media de 6 ensayos realizados de forma independiente.

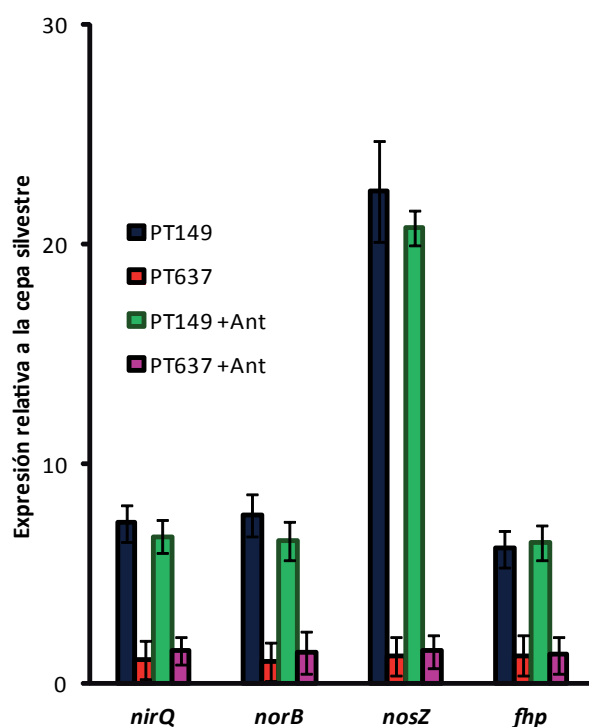


## 4.6 Efectos de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre el metabolismo de generación de energía de *P. aeruginosa*

### 4.6.1 La cadena de respiración de nitrato se activa en condiciones aeróbicas en el mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN

Como se mencionó anteriormente, la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN activa los genes de la cadena de respiración de nitrato en condiciones aeróbicas.

En los resultados del análisis transcriptómico encontramos que en fase logarítmica y sólo en la cepa PT149 los genes *norC*, *nosZ* y *fhp* presentan niveles de expresión mayores que en la cepa silvestre. A continuación se evaluó la expresión de todos los operones de la cadena de respiración de nitrato mediante RT-PCR en tiempo real. Todos los operones, con excepción del operón *nar*, presentan niveles de expresión superiores a los de la cepa silvestre y ante la presencia de antranilato no se recuperan los niveles de expresión de estos genes (Figura 4.20). Estos resultados podrían indicar que debido a la acción de la bomba e independientemente del sistema de *quorum sensing* se activa el funcionamiento de la cadena de respiración de nitrato en condiciones aeróbicas. Nuestra hipótesis se basa en que esta activación tiene su origen en el exceso de protones que puede haber en el citoplasma de la célula, causado por la sobre-expresión de MexEF-OprN. Con el fin de evitar la acidificación del citoplasma la célula activa mecanismos que le permitan librarse del exceso de protones, incluyendo el aumento de la respiración aeróbica, lo que podría generar la activación de la cadena de respiración de nitrato; por el déficit de oxígeno al interior de la célula.



**Figura 4.20. Efecto de la adición de antranilato sobre la expresión de la cadena respiratoria de nitrato.** Con el fin de analizar si la adición de antranilato permite que los mutantes recuperen los niveles de expresión de la cadena respiratoria de nitrato, las cepas PT149 y PT637 se crecieron en medio LB con 1mM de antranilato y se evaluó la expresión de los componentes de esta cadena de esta cadena mediante RT-PCR en tiempo real. La adición de antranilato no permite recuperar los niveles de expresión de la cepa silvestre.

#### 4.6.2 El mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN es más sensible a los donadores de óxido nítrico: nitroprusiato de sodio (SNP) y S-nitroglutation (GSNO)

La activación de la cadena de respiración de nitrato que hemos descrito anteriormente también induce la producción de óxido nítrico, compuesto muy tóxico para la célula, más aún bajo condiciones aeróbicas (Arai y cols., 2005; Arai y cols., 1995). Con el fin de observar el efecto de un exceso de óxido nítrico sobre el mutante que sobre-expresa la bomba, se utilizaron dos donadores de NO, nitroprusiato de sodio (SNP) y S-nitroglutation (GSNO). Para ambos compuestos se determinó la CMI; como se puede apreciar en la tabla 4.9, la cepa PT149 es más sensible que las cepas silvestre (PT5) y PT637, a pesar de que aumenta la expresión de proteínas que participan en la desintoxicación del NO (operón *nor* y la proteína Fhp).

CMI mg/ml			
	PT5	PT149	PT637
<b>SNP</b>	15	5	12
<b>GSNO</b>	5	4	5

**Tabla 4.9. Determinación de la CMI para SNP y GSNO.** Mediante la técnica de doble dilución en medio LB se determinó la CMI para los compuestos donadores de óxido nítrico SNP y GSNO.

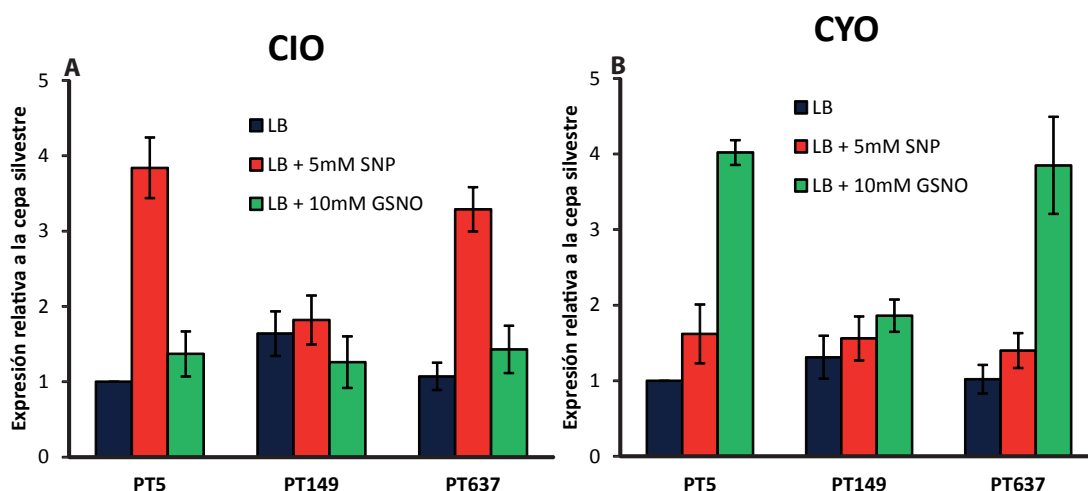
Para determinar el efecto del SNP sobre el crecimiento de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN, estos se crecieron en 5 mM y 15 mM de SNP (concentraciones subinhibitorias) y se determinó el tiempo de duplicación para cada una de las concentraciones. El mutante PT149 crece más lentamente en presencia de SNP si se le compara con las cepas PT5 y PT637 (Tabla 4.10). Estos resultados sugieren que la activación de la cadena de respiración de nitrato tiene como consecuencia la acumulación de NO intracelular, generando un aumento en la susceptibilidad a donadores externos de NO.

Tiempo de Duplicación (min)			
	PT5	PT149	PT637
<b>LB</b>	38 ± 3	37 ± 2	38 ± 2
<b>5 mM SNP</b>	55 ± 4	92 ± 8	58 ± 6
<b>15 mM SNP</b>	166 ± 12	516 ± 23	176 ± 17

**Tabla 4.10. Determinación del tiempo de duplicación con concentraciones sub-inhibitorias de SNP.** El valor representa la media de tres experimentos independientes.

Se ha descrito que una de las primeras barreras contra la intoxicación por NO, en condiciones aerobias, es el aumento diferencial en la expresión de las oxidasas terminales CIO y CYO. El SNP activa la expresión de CIO y el GSNO de CYO (Comolli y Donohue, 2004; Cooper y cols., 2003; Kawakami y cols., 2010). Para analizar el comportamiento de estas oxidasas terminales se midió su expresión en las cepas: silvestre, PT149 y PT637; en medio LB, LB con 5 mM de SNP y LB con 10 mM de GSNO. Como se puede observar en la figura 4.21 la adición de estos donadores de NO, no induce la expresión de las oxidasas terminales mencionadas en la cepa PT149. Por el contrario, en la cepa PT637 hay una

inducción semejante a la observada en la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que la activación de la cadena respiratoria de nitrato en condiciones aeróbicas, inhibe la actividad de desintoxicación por parte de estas enzimas.



**Figura 4.21. Efecto de la sobre-expresión de MexEF-OprN en la activación de las oxidasas terminales CIO y CYO mediada por SNP y GSNO.** Ante la presencia de SNP y GSNO se activa diferencialmente la expresión de las oxidasas terminales CIO y CYO respectivamente. Mediante RT-PCR en tiempo real se evaluó la expresión de estas oxidasas en condiciones de inducción. Como se puede apreciar en la figura, en la cepa PT149 no se induce la expresión de CIO en presencia de SNP (**Panel A**), ni la de CYO en presencia de GSNO (**Panel B**).

#### 4.6.3 Efectos de la sobre-expresión de las bombas MexAB-oprM, MexCD-OprJ y MexXY sobre la cadena respiratoria de nitrato en *P. aeruginosa*.

Resultados

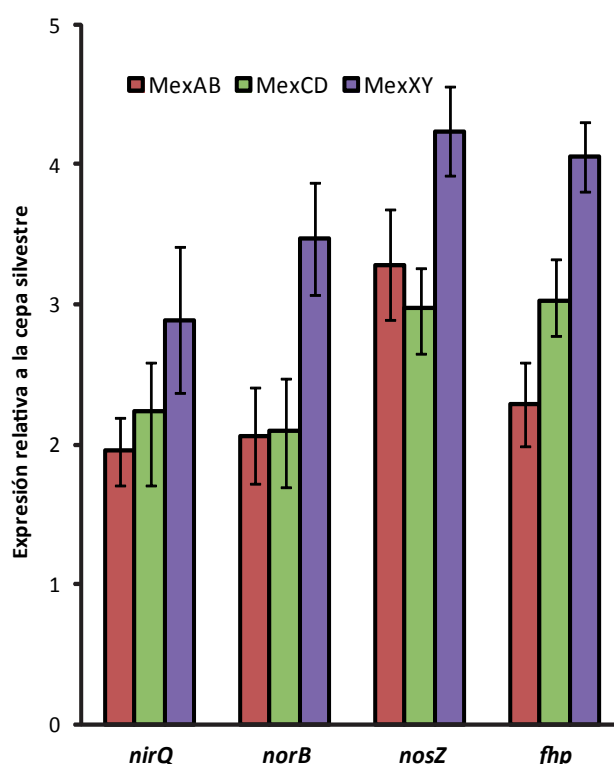
En base a los resultados obtenidos en el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN se decidió analizar el comportamiento de mutantes que sobre-expresan otras bombas tipo RND en *P. aeruginosa*. Se utilizaron cepas que sobre-producen MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY y se determinaron las CMI's para SNP. En la tabla 4.11 podemos observar que todos los mutantes que sobre-expresan bombas presentan una CMI menor a la de la cepa silvestre (PAO1-V). También se calculó el tiempo de duplicación en concentraciones subinhibitorias del compuesto y al igual que MexEF-OprN, estos mutantes crecen más despacio que su respectiva cepa silvestre.

	Tiempo de Duplicación (min)			
	PAO1-V	MexAB	MexCD	MexXY
LB	36 ± 4	37 ± 3	46 ± 2	43 ± 4
5 mM SNP	59 ± 6	87 ± 11	154 ± 17	161 ± 14
15 mM SNP	115 ± 19	586 ± 34	642 ± 29	642 ± 18
CMI (mg/ml)	15	10	8	5

**Tabla 4.11.** Estimación de la CMI y cálculo del tiempo de duplicación para SNP en mutantes que sobre-expresan bombas de la familia RND.

La mayor sensibilidad a SNP presentada por los mutantes que sobre-expresan estas bombas podría estar asociada a la activación en condiciones aerobias de la cadena respiratoria de nitrato. Por esta razón se midió la expresión de los genes involucrados en esta cadena. En la figura 4.22 podemos apreciar que *nirQ*, *norB*, *nosZ* y *fhp* presentan niveles de expresión mayores a los de la cepa silvestre en todos los mutantes evaluados, es decir, todos los operones involucrados en la cadena respiratoria de nitrato se encuentran activos.

Estos resultados pueden sugerir que la sobre-expresión de las bombas tipo RND estaría produciendo altas cantidades de NO endógeno debido a la activación de la cadena respiratoria de nitrato, lo que las hace mucho más sensibles cuando este elemento es aportado en forma exógena.

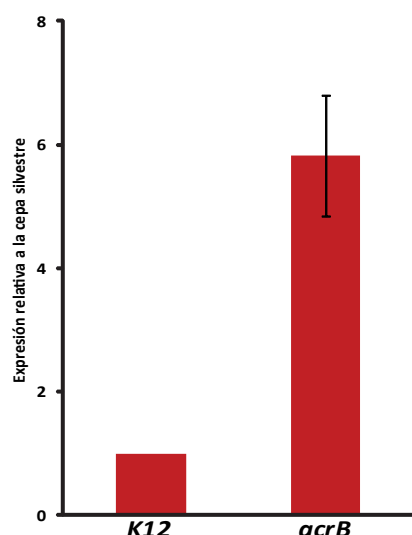


**Figura 4.22. Análisis de la expresión mediante RT-PCR en tiempo real de los genes de la cadena respiratoria de nitrato en mutantes que sobre-expresan bombas RND.** En todos los mutantes que sobre-expresan bombas RND evaluados, aumenta la expresión de la cadena respiratoria de nitrato

#### 4.6.4 Efecto de la sobre-expresión de AcrAB-TolC sobre la reducción de nitrito en *E. coli* K12

Como se observó en *P. aeruginosa*, las bombas del tipo RND activan la cadena de respiración de nitrato en condiciones aeróbicas. Si bien *E. coli* no presenta la cadena completa, esta bacteria puede utilizar nitrato y/o nitrito como último aceptor de electrones para generar energía en condiciones anaeróbicas o de microaerobiosis (Corker y Poole, 2003). La reducción de nitrito está mediada por el operón *nrf* y su expresión está regulada por la proteína FNR, homóloga de DNR en *P. aeruginosa* (Ji y Hollocher, 1988a, b). Por otra parte, esta bacteria presenta en su genoma al menos 6 operones que codifican bombas tipo RND, siendo la más estudiada AcrAB-TolC (Nikaido y Zgurskaya, 2001). Para

analizar los efectos de esta bomba en la reducción de nitrito y la consiguiente producción de NO, se obtuvo un mutante (JO0305) que sobre-expresa AcrAB-TolC mediante pases sucesivos de la cepa K12 en concentraciones crecientes de tetraciclina. Después de llegar a una concentración 12 µg/ml de este antimicrobiano se demostró que AcrAB-TolC estaba siendo sobre-expresada mediante RT-PCR en tiempo real (Figura 4.23).



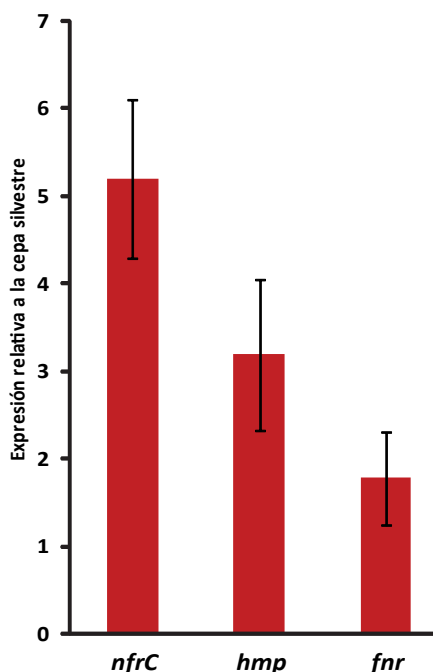
**Figura 4.23. Verificación del mutante de *E. coli* que sobre-expresa la bomba AcrAB-TolC.** Mediante RT-PCR en tiempo real se determinaron los niveles de expresión del gen *acrB*, demostrando que el mutante sobre-expresa la bomba AcrAB-TolC.

Una vez obtenido el mutante JO0305, se hicieron curvas de crecimiento para calcular el tiempo de duplicación en medio LB. En la tabla 4.12 se puede apreciar que JO0305 crece más lentamente que la cepa silvestre. Teniendo en cuenta los resultados de los mutantes de *P. aeruginosa* que sobre-expresan bombas tipo RND, se determinó la CMI de SNP para la cepa JO0305. En este caso, observamos que este mutante es más sensible al SNP que la cepa silvestre (Tabla 4.12). Esto podría sugerir que la cepa JO0305 está produciendo más NO endógeno que la K12 silvestre. Con este resultado, se midió la expresión mediante RT-PCR en tiempo real de *nfrC*, gen fundamental en la reducción de nitritos y *hmp* gen homólogo al *fhp* de *P. aeruginosa*. Como se aprecia en la figura 4.24 la expresión de estos genes se ve aumentada en la cepa JO0503. La activación de esta vía de asimilación de nitrato depende de la proteína FNR. Para comprobar si existe algún cambio en su expresión se midió por RT-PCR en tiempo real el gen que codifica esta proteína y encontramos que estaba ligeramente sobre-expresada.

Con estos resultados podemos decir que la cepa JO0305 presenta el mismo comportamiento que las cepas que sobre-expresan bombas tipo RND en *P. aeruginosa*.

	Tiempo de Duplicación (min)	
	K12	JO0305
<b>LB</b>	32±3	56±5
<b>5 mM SNP</b>	225 ± 17	307 ± 23
<b>15 mM SNP</b>	324 ± 28	521 ± 39
<b>CMI (mg/ml)</b>	30 mM	17 mM

**Tabla 4.12. Estimación de la CMI y cálculo del tiempo de duplicación para SNP en el mutante de *E. coli* que sobre-expresa la bomba AcrAB-TolC.** El tiempo de duplicación y la CMI fueron calculados tanto para la cepa silvestre (K12) como para el mutante que sobre-expresa AcrAB-TolC (JO0305).



**Figura 4.24. Análisis de la expresión de genes que participan en la asimilación de nitrito en *E. coli*.** Mediante RT-PCR en tiempo real se midió la expresión de los genes *nfrC*, *hmp* y *fnr*, para determinar si la sobre-expresión de AcrAB-TolC en *E. coli* activa esta vía de obtención de energía.

#### 4.7 Efecto de la disponibilidad de oxígeno en los mutantes que sobre-expresan bombas tipo RND

##### 4.7.1 Consumo de oxígeno de los mutantes de *P. aeruginosa* y *E. coli* que sobre-expresan bombas tipo RND

Con el fin de analizar la hipótesis de que la sobre-expresión de bombas tipo RND genera un aumento en la respiración aeróbica, se midió el consumo de oxígeno en las cepas: PT5, PT149, PT637, MexAB-OprN, MexCD-OprJ y MexXY de *P. aeruginosa* y las cepas K12 y JO0305 de *E. coli*.

En la tabla 4.13 se resumen los resultados obtenidos para cada una de ellas. Encontramos que todas las cepas que sobre-expresan bombas tipo RND presentan un consumo de oxígeno superior a sus respectivas cepas silvestres. Así por ejemplo, PT149 consume 213,55 nmol de  $O_2$ /gr x min., mientras que PT5 sólo consume oxígeno a una velocidad de 132,11 nmol de  $O_2$ /gr x min, lo que significa un 60,1% más rápido que su respectiva cepa silvestre. Además, podemos observar que después de PT149, MexXY es el mutante que consume oxígeno a mayor velocidad -48,8% más rápido- que su respectiva cepa silvestre. Aunque los otros mutantes también consumen oxígeno a mayor velocidad que sus respectivas cepas silvestres no presentaron valores similares a los de PT149 o MexXY. Por otra parte, la cepa de *E.coli* JO0305 consume oxígeno a una velocidad 9,6% superior que la *E. coli* silvestre K12.

Con estos resultados podemos afirmar que los mutantes que sobre-expresan bombas tipo RND consumen más oxígeno que su respectiva cepa silvestre debido al funcionamiento de la bomba.

##### 4.7.2 Efectos de la adición de oxígeno en cultivos del mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN

Una vez demostrada la hipótesis de que los mutantes que sobre-expresan bombas tipo RND consumen más oxígeno que su respectiva cepa silvestre, se evaluó el efecto que genera la adición permanente de oxígeno sobre las cepas PT5, PT149 y PT637. Estas cepas se crecieron en un fermentador

bajo condiciones de adición de aire a saturación (300 ml/min); como control se utilizaron cultivos no suplementados con este gas.

	PT5	PT149	PT637	PAO1-V	MexAB	MexCD	MexXY	K12	JO0305
<b>Concentración nmol O<sub>2</sub>/gr x min</b>	132,11	213,55	134,7	137,77	159,06	152,33	204,56	148,75	163,12
<b>% respecto cepa silvestre</b>	100	160,1	101,9	100	115,4	110,6	148,5	100	109,7
<b>Niveles de expresión bombas</b>	NE	112,6	NE	NE	8,32	6,16	16,51	NE	5,98

**Tabla 4.13. Consumo de oxígeno de los diferentes mutantes que sobre-expresan bombas RND en *P. aeruginosa* y *E. coli*.** Utilizando un oxímetro se midió el consumo de oxígeno de los mutantes que sobre-expresan bombas RND y se compararon con sus respectivas cepas silvestres. Los valores se relacionaron con los niveles de expresión presentados por cada uno de los mutantes. Los valores mostrados corresponden a la media de 6 experimentos independientes.

Para medir los efectos de la adición de aire se calculó el tiempo de duplicación en todos los casos. En la tabla 4.14 podemos apreciar que el tiempo de duplicación en el medio no aireado es muy similar al tiempo obtenido en matraces, por tanto las condiciones de no aireación son similares a las condiciones de crecimiento en matraz. Por otra parte, la velocidad de crecimiento en los cultivos aireados es casi un 40% superior que los no aireados tanto en PT5 como en PT149 y PT637.

Condición Utilizada	Tiempo de Duplicación (min)		
	PT5	PT149	PT637
<b>Fermentador (C/Aire)</b>	23 ± 3	25 ± 1	25 ± 3
<b>Fermentador (S/Aire)</b>	38 ± 4	39 ± 6	41 ± 8
<b>LB Matraz</b>	38 ± 3	37 ± 2	38 ± 2

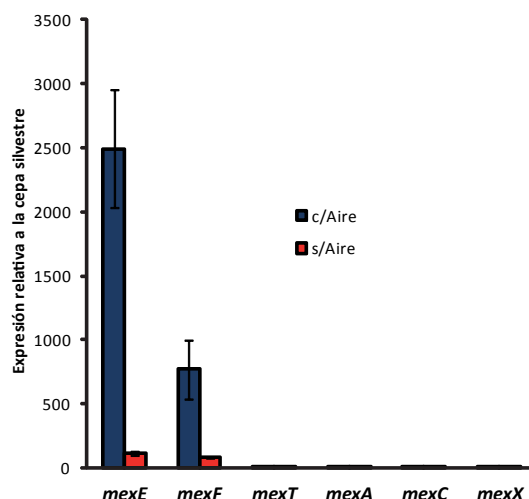
**Tabla 4.14. Determinación del tiempo de duplicación en fermentador.** Los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN fueron cultivados en un fermentador utilizando dos condiciones: (i) con aireación constante y (ii) sin aireación. Los valores mostrados corresponden a la media de 3 experimentos independientes y se compararon con los cultivos realizados en matraz.

#### 4.7.3 Efecto de la adición de oxígeno sobre los genes expresados diferencialmente en la cepa PT149.

Después de fijar las condiciones óptimas de aireación de los cultivos, se midió la expresión de los genes que variaban a causa de la sobre-expresión de MexEF-OprN. La extracción de ARN fue realizada a una DO<sub>600</sub> de 0,6. Se pudo observar que a esta densidad óptica los cultivos aireados presentan una saturación de oxígeno de aproximadamente 80%, mientras que en los cultivos no aireados la saturación no superaba el 5%. Este 5% todavía no es considerado microaerobiosis ya que este estado fisiológico comienza cuando la saturación de oxígeno es de alrededor de un 1% (Arai y

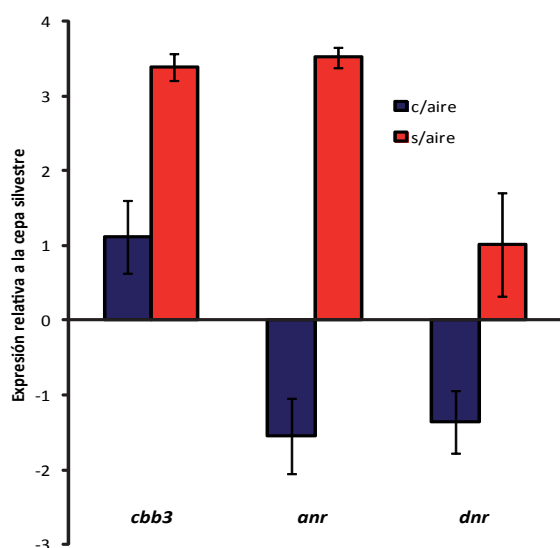
cols., 1995; Chen y cols., 2006).

Encontramos que la expresión de la bomba MexEF-OprN aumenta considerablemente en condiciones de aireación. Por el contrario, en los cultivos no aireados los niveles de expresión de esta bomba mostraron valores muy similares a los presentados en los cultivos crecidos en matraces (Figura 4.25). Para determinar si el efecto de la oxigenación es específico para MexEF-OprN, se midió la expresión de las bombas MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY en el mutante PT149. La figura 4.25 muestra que ninguna de estas bombas aumenta su expresión bajo condiciones de aireación.



**Figura 4.25. Análisis de la expresión de diferentes bombas RND en el mutante PT149.** Con el fin de determinar el efecto de la adición de oxígeno sobre la expresión de las bombas RND en el mutante PT149, se midió la expresión de los sistemas MDR MexEF-OprN, MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY mediante RT-PCR en tiempo real.

Con el fin de determinar el estado fisiológico de las bacterias presentes en los cultivos no aireados, se midió la expresión de los genes indicadores de baja concentración de oxígeno: la oxidasa terminal *cbb<sub>3</sub>-2* (PA1557) y los activadores transcripcionales de anaerobiosis *anr* y *dnr*. En los cultivos en matraces estos genes no muestran variación en el mutante que sobre-expresa la bomba (PT149). Sin embargo, en los cultivos no aireados vemos que tanto *cbb<sub>3</sub>* como *anr* aumentan su expresión en dicho mutante (Figura 4.26). Por otra parte *dnr* no presenta variaciones en su expresión.



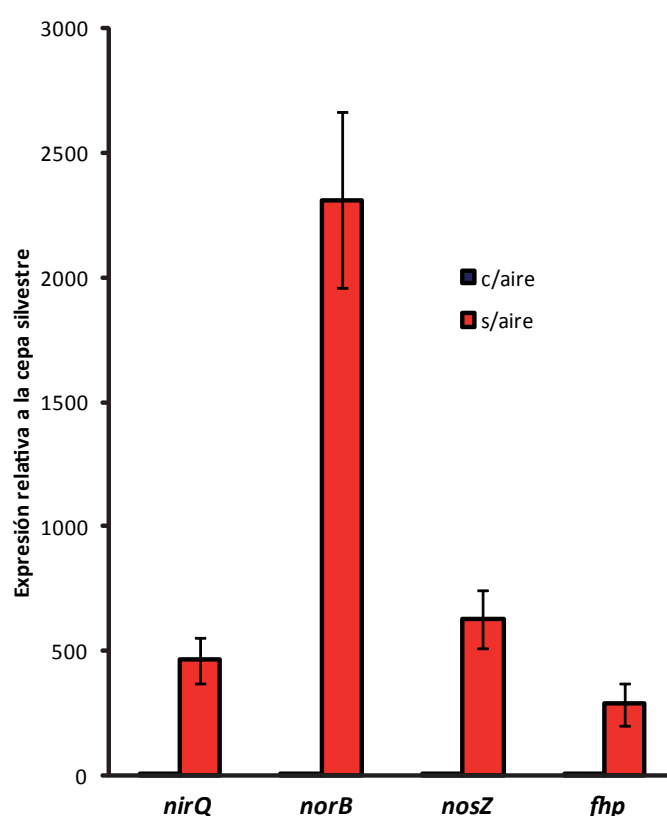
**Figura 4.26. Análisis de la expresión de *cbb<sub>3</sub>-2*, *anr* y *dnr* en la cepa PT149.** Para determinar el estado fisiológico en los cultivos realizados en el fermentador se midió la expresión de los genes que se activan en condiciones de baja concentración de oxígeno. En condiciones de aireación permanente (c/aire) estos genes presentaron valores similares a los de la cepa silvestre. En condiciones de no aireación (s/aire) sólo *cbb<sub>3</sub>-2* y *anr* aumentaron su expresión.



#### 4.7.4 Variación de la expresión de genes de la cadena respiratoria de nitrato bajo condiciones de aireación en el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN

Para evaluar el efecto de la aireación sobre los genes de la cadena respiratoria de nitrato se midió su expresión mediante RT-PCR en tiempo real en las cepas PT5, PT149 y PT637. Encontramos que todos los operones involucrados en la respiración de nitrato recuperan los niveles de expresión mostrados por la cepa silvestre (Figura 4.27). Por otra parte, los niveles de expresión bajo condiciones de no aireación fueron más altos que los obtenidos en matraces en todos los genes evaluados. El operón *nir* presentó un aumento de más de 300 veces comparado con PT5. Por otra parte, *norB* presentó un aumento de expresión 2300 veces superior a la cepa silvestre (PT5). Finalmente el operón *nos* aumentó su expresión 600 veces cuando se compara con la cepa silvestre. Como era de esperar, la proteína Fhp también aumentó su expresión en los cultivos no aireados. El gran aumento de expresión del operón *nor* y de la proteína Fhp sugiere que la activación de esta cadena respiratoria genera óxido nítrico.

El incremento de la expresión de los genes de la cadena respiratoria de nitrato y la activación de la expresión de genes marcadores de baja concentración de oxígeno en los cultivos no aireados de la cepa PT149, sugiere que la concentración intracelular de oxígeno no es suficiente para el crecimiento normal de la bacteria, debiendo activar vías alternativas de generación de energía.



**Figura 4.27. Análisis de la expresión de la cadena respiratoria de nitrato en la cepa PT149.** La expresión diferencial de los genes de la cadena respiratoria de nitrato medida en condiciones de aireación permanente (**c/aire**) y sin aireación (**s/aire**). Los cultivos aireados recuperan los niveles de expresión de la cepa silvestre

#### 4.8 Efecto de la delección del gen *nirS* sobre la cadena respiratoria de nitrato en la cepa PT149

##### 4.8.1 La delección del gen *nirS* inhibe la expresión de la cadena respiratoria de nitrato y recupera el fenotipo de sensibilidad a SNP en la cepa PT149

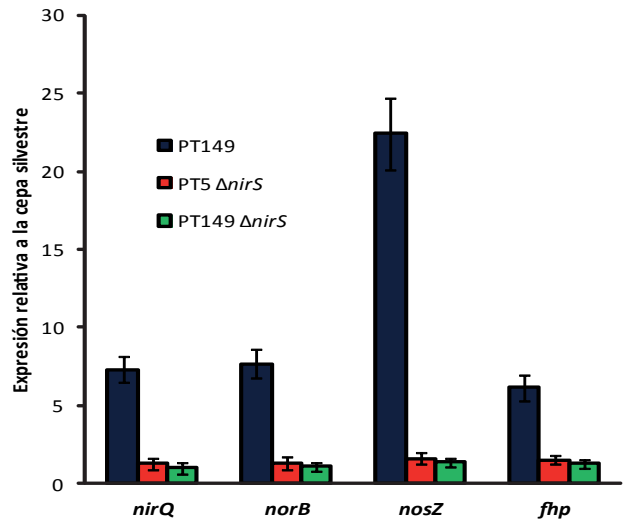
Con el fin de analizar la importancia de la activación de la cadena respiratoria de nitrato en condiciones aeróbicas sobre el *fitness* de la cepa PT149, se construyó un mutante de delección del gen *nirS* ( $149\Delta nirS$ ); el cual actúa como regulador del operón *nir* (Arai y cols., 1995). El operón *nir* es el encargado de la reducción de nitrito a óxido nítrico; si *nirS* es eliminado la cadena queda inactiva. La delección se hizo también en la cepa silvestre ( $PT5\Delta nirS$ ), con el fin de analizar cualquier efecto, independiente de la sobre-expresión de MexEF-OprN, que pudiese tener *nirS* sobre la fisiología global de *P. aeruginosa*.

La primera prueba que se realizó con estos mutantes fue calcular el tiempo de duplicación de cada uno de ellos. En la tabla 4.15 podemos apreciar que la velocidad de crecimiento no presentó cambios respecto a sus cepas silvestres (PT5 y PT149) lo que indica que la ausencia de *nirS* no afecta el funcionamiento normal de la bacteria.

	PT5	PT149	PT5 $\Delta nirS$	PT149 $\Delta nirS$
LB	38 $\pm$ 3	37 $\pm$ 2	37 $\pm$ 1	37 $\pm$ 2
5 mM SNP	55 $\pm$ 4	92 $\pm$ 8	46 $\pm$ 5	56 $\pm$ 3
15 mM SNP	166 $\pm$ 12	516 $\pm$ 23	58 $\pm$ 3	146 $\pm$ 18
CMI (mg/ml)	15	5	18	14

**Tabla 4.15.** Estimación de la CMI y cálculo del tiempo de duplicación para SNP en el mutante de delección de *nirS*.

Estos mutantes también fueron sometidos a la acción del SNP. Como observamos en la tabla 4.15  $PT149\Delta nirS$  presenta un tiempo de duplicación muy similar a la cepa silvestre en concentraciones subinhibitorias de SNP. Asimismo,  $PT149\Delta nirS$  recupera los niveles de sensibilidad de la cepa silvestre bajo estas condiciones. También, se midieron los niveles de expresión de los genes involucrados en la cadena respiratoria de nitrato y se comprobó que todos ellos presentan niveles de expresión similares a los de la cepa silvestre (Figura 4.28).

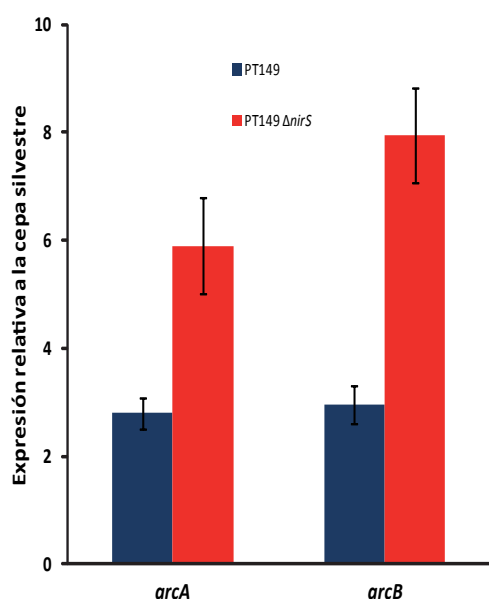


**Figura 4.28.** Verificación de la inactivación de la cadena respiratoria de nitrato. Mediante RT-PCR en tiempo real se comprobó que la cadena respiratoria de nitrato está inactiva en los mutantes de delección  $PT149\Delta nirS$  y  $PT5\Delta nirS$ .

#### 4.8.2 La inactivación de la cadena respiratoria de nitrato en el mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN induce la vía de obtención de energía de la arginina-deiminasa

Ya se demostró que el mutante PT149 $\Delta$ nirS recupera el fenotipo de susceptibilidad al SNP. Como se mencionó anteriormente, la activación de la cadena de respiración de nitrato podría ser fundamental para evitar el coste de *fitness* causado por la sobre-expresión de MexEF-OprN. No obstante, la eliminación de la cadena respiratoria de nitrato no supone grandes diferencias cuando la cepa PT149 crece en medio LB (Tabla 4.15). Al parecer, la bacteria podría activar otras vías de obtención de energía para suplir la falta de la cadena de nitrato. Uno de los mecanismos empleado para obtener energía es la ruta de la arginina-deiminasa. Esta vía consiste en la transformación de L-arginina en L-ornitina y carbamilo-fosfato con la consiguiente generación de ATP (Luthi y cols., 1990; Vander Wauven y cols., 1984). Este proceso está mediado por las enzimas AcrABC codificadas en el operón *acrABC*. Con el fin de analizar si este operón se activa cuando se inhibe la cadena respiratoria de nitrato, se midió la expresión de los genes *acrA* y *acrB*. En la figura 4.29 podemos observar que ante la ausencia de la cadena respiratoria de nitrato, *P. aeruginosa* activa la expresión de esta vía de obtención de energía para evadir el coste de *fitness* generado por la sobre-expresión de MexEF-OprN.

Estos resultados sugieren que *P. aeruginosa* evita el coste de *fitness* causado por la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN, activando vías alternativas de generación de energía



**Figura 4.29. Activación de la vía de la arginina deiminasa.** Mediante RT-PCR en tiempo real se midió la expresión de los genes *arcA* y *arcB* que participan en la vía de obtención de energía de la arginina deiminasa. Se comparó la expresión de las cepas PT149 y PT149 $\Delta$ nirS. La ausencia de la cadena respiratoria de nitrato activa la expresión de otras vías de generación de energía

#### 4.9 Producción de óxido nítrico y consumo de nitrato en el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN

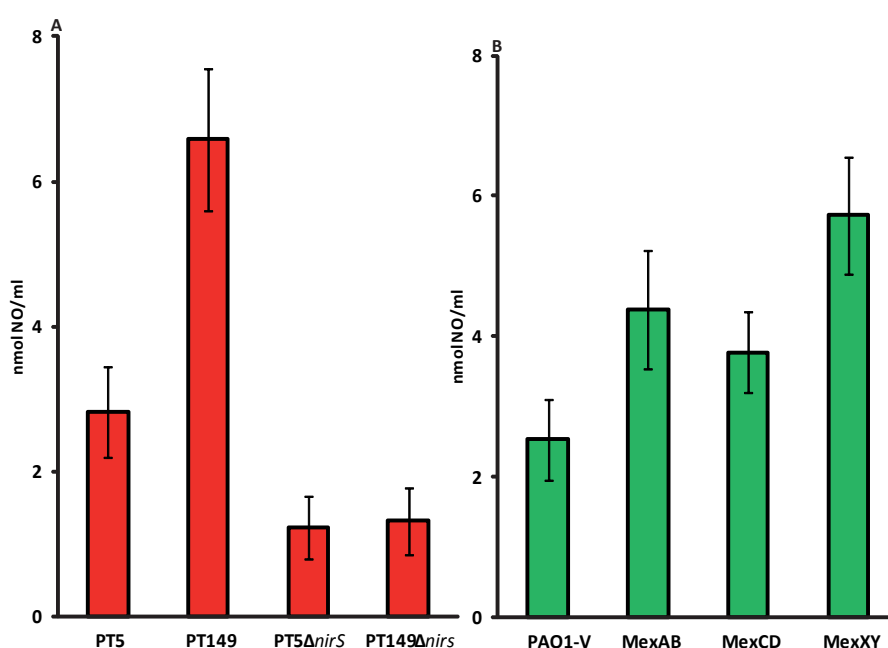
##### 4.9.1 Los mutantes que sobre-expresan bombas RND producen mayor cantidad de NO

Mediante RT-PCR en tiempo real se determinó que los genes encargados de la desintoxicación de óxido nítrico (*norC* y *fhp*) presentan mayores niveles de expresión en todos los mutantes que sobre-expresan bombas tipo RND en *P. aeruginosa*. En base a estos resultados se midió la producción de óxido nítrico de cada uno de ellos a una DO<sub>600</sub> de 0,6. Para medir la producción de este gas se utilizó un

kit comercial basado en métodos colorimétricos que permite determinar variaciones en la producción de este compuesto. En la figura 4.30A se puede observar que la cepa PT149 produce el doble de óxido nítrico que la cepa silvestre, PT5. Como control podemos apreciar que los mutantes de delección de *nirS* PT5 $\Delta$ *nirS* y PT149 $\Delta$ *nirS* producen bajas cantidades de NO.

También se midió la producción de NO en los mutantes que sobre-expresan MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY. Todos estos mutantes producen más óxido nítrico que su respectiva cepa silvestre (PAO1-V) (Figura 4.30B). Pero de todas ellas es MexXY la que más se acerca a los valores de la cepa PT149 ya que los mutantes que sobre-expresan MexAB y MexCD presentan valores que apenas sobrepasan a los de su respectiva cepa silvestre (PAO1-V).

De esta forma los resultados obtenidos nos sugieren que la sobre-expresión de bombas tipo RND producen NO debido a la activación de la cadena respiratoria de nitrato.



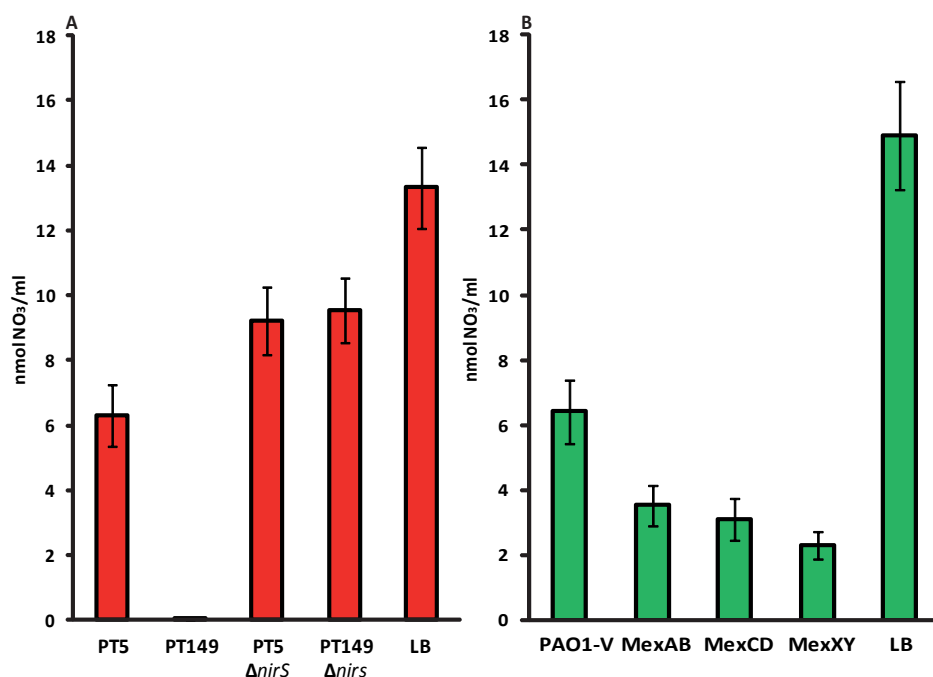
**Figura 4.30. Producción de óxido nítrico.** Para demostrar que la sobre-expresión de bombas RND activan la cadena respiratoria de nitrato, se midió la producción de óxido nítrico en los mutantes que sobre-expresan este tipo de bombas y se compraron con su respectiva cepa silvestre (Paneles A y B). Los mutantes de delección del gen *nirS* no producen NO debido a la inactivación de esta cadena.

#### 4.9.2 El consumo de nitrato aumenta en los mutantes que sobre-expresan bombas tipo RND

La activación de la cadena de respiración de nitrato, supone dos condiciones indispensables: baja concentración de oxígeno y presencia de nitrato en el medio (Arai y cols., 1995). La cantidad de nitrato en el medio LB es hasta ahora desconocida. Utilizando un kit colorimétrico se midió la concentración de este compuesto en el medio LB; ésta varía en un rango de 13-15 nmol/ml. Con este resultado se procedió a medir el consumo de nitrato en las cepas PT5, PT149, PT5 $\Delta$ *nirS* y PT149 $\Delta$ *nirS*. Encontramos que después de 24 horas de cultivo, la cepa PT149 consume casi todo el nitrato disponible en el medio, por el contrario la cepa PT5 sólo consume la mitad de este compuesto (Figura

4.31A). Finalmente, las cepas PT5 $\Delta nirS$  y PT149 $\Delta nirS$  sólo consumen una pequeña cantidad del nitrato presente en el medio.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se midió el consumo de nitrato en los mutantes que sobre-expresan MexAB-OprN, MexCD-OprJ y MexXY, después de 24 horas de cultivo. La figura 4.31B muestra que todos los mutantes que sobre-expresan estas bombas consumen más nitrato que su respectiva cepa silvestre (PAO1-V). Aunque ninguna de ellas logra agotar completamente el nitrato del medio como lo hace la cepa PT149.



**Figura 4.31. Consumo de nitrato desde el medio LB.** El nitrato disponible en el medio fue medido antes de iniciar los cultivos (LB). Después de 24 horas de cultivo se determinó la concentración de nitrato en los mutantes que sobre-expresan bombas tipo RND y se comparó con su respectiva cepa silvestre (Paneles A y B).

### 4.9.3 La presencia de nitrato es necesaria para evitar el coste de *fitness* causado por la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN

Dado que la cepa PT149 consume todo el nitrato del medio después de 24 horas de cultivo, se decidió usar este medio (*spent*), en el que ya no hay nitrato, para volver a crecer las cepas PT5 (cepa silvestre), PT149 y PT637. Este experimento nos permitió analizar el efecto de la ausencia de nitrato sobre la capacidad de crecimiento de estas cepas. Como podemos observar en la tabla 4.16 la cepa PT149 crece un 40% más lento al compararla con PT5 y PT637, las cuales mostraron valores similares entre ellas.

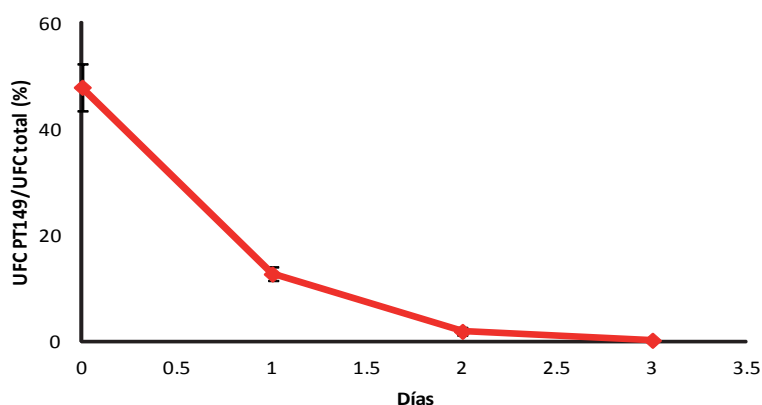
Para demostrar que esta deficiencia de crecimiento es debida a la ausencia de nitrato, se adicionó 20  $\mu$ M de KNO<sub>3</sub> al medio *spent*. El suplemento del medio con este compuesto permitió que la cepa PT149 alcanzara los niveles de crecimiento mostrados por la cepa silvestre (PT5) (Tabla 4.16). Esto sugiere que el nitrato es fundamental para evitar el coste de *fitness* provocado por la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN.

Medio	Tiempo de Duplicación (min)		
	PT5	PT149	PT637
LB spent (s/NO <sub>3</sub> )	255 ± 27	308 ± 24	262 ± 32
LB spent + 20 µM KNO <sub>3</sub>	252 ± 29	258 ± 31	266 ± 28

**Tabla 4.16.** Tiempo de duplicación en medio LB carente de nitrato.

Cuando se realizaron los experimentos de competición en medio LB se encontró que la cepa silvestre es incapaz de desplazar al mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN. Para analizar con mayor detalle qué sucedía en el medio *spent* se puso a competir la cepa PT149 con la cepa silvestre (PT5) en co-cultivo. Con el objetivo de determinar la variación de la población se tomaron muestras cada 24 horas y fueron sembradas en medio con y sin cloranfenicol. Después de 24 horas de cultivo sólo un 12% de la población corresponde al mutante PT149 y después de 48 horas apenas un 2% de la población corresponde a PT149. Finalmente y después de 72 horas la cepa PT149 desaparece completamente del cultivo (Figura 4.32)

### MexEF- OprN vs wt



**Figura 4.32.** Estimación del *fitness* relativo de la cepa PT149 en medio LB carente de nitrato. La cepa PT149 se creció en co-cultivo con la cepa silvestre PT5. Transcurridos 3 días de cultivo, la cepa silvestre desplaza completamente a la cepa PT149.

Estos resultados indican que el nitrato es fundamental para el normal crecimiento de la cepa que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN en medio LB y que es vital para evitar el coste de *fitness*.

## DISCUSIÓN

---





## 5 Discusión

La introducción de los antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas ha sido uno de los avances más importantes de la medicina del siglo pasado. Sin embargo, el uso intensivo de estos medicamentos ha aumentado la frecuencia de aparición de resistencia en bacterias patógenas humanas (Guay, 2008; Lew y cols., 2008; Woodford y Livermore, 2009). Este aumento en la frecuencia de aparición de organismos resistentes ha reducido considerablemente la capacidad de tratar infecciones en forma efectiva (Andersson y Hughes, 2010). Pero esta tendencia no sólo afecta a los patógenos humanos ya que también es frecuente la aparición de resistencia en patógenos de animales (Cabello, 2006) y plantas debido a la contaminación del medio ambiente tanto con los antibióticos, como con los genes de resistencia (Martínez, 2009a).

Una de las características de la adquisición de resistencia a los antibióticos es que puede causar un coste en el *fitness* de los organismos (Andersson y Levin, 1999). Este coste está relacionado directamente con la capacidad que tiene un organismo de vivir en un ambiente determinado. Si bien la adquisición de resistencia es una ventaja selectiva mientras el antibiótico permanece en el ambiente, ante la ausencia de la droga (presión selectiva), los organismos resistentes serían menos eficaces que los sensibles y las poblaciones resistentes serían eliminadas del medio (Andersson y Levin, 1999; Levin y cols., 1997). Uno de los puntos más importantes a considerar en la eficacia biológica entre dos poblaciones, es la capacidad que tiene cada una de ellas de reproducirse en un ambiente determinado. En esta línea los estudios experimentales para determinar el coste de *fitness* están centrados fundamentalmente en comparar la velocidad de crecimiento, la capacidad de sobrevivir a una determinada condición o bien en la competición entre cepas sensibles y cepas resistentes (Bjorkman y cols., 1998; Bjorkman y cols., 1999; Bouma y Lenski, 1988; Levin y Stewart, 1980; Schrag y cols., 1997). Es necesario tener en cuenta que el *fitness* es una medida relativa, por lo mismo debería ser medido en diferentes ambientes para establecer una aproximación detallada del impacto de la adquisición de un determinante de resistencia (Bjorkman y cols., 1998; Bjorkman y cols., 2000).

Con el fin de establecer la relación entre el coste de *fitness* y la adquisición de un determinante de resistencia elegimos a *P. aeruginosa*, organismo modelo en el estudio de la resistencia a los antibióticos (Poole y cols., 1993). Esta bacteria presenta múltiples componentes que participan en la resistencia a los antibióticos y entre los más estudiados se encuentran las bombas MDR. Para este organismo se han descrito 12 bombas de expulsión de drogas del tipo RND (Poole, 2007; Schweizer, 2003), pero sólo las bombas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY han sido estudiadas en profundidad (Jeannot y cols., 2008; Poole, 2005). Con excepción de MexEF-OprN, la regulación de estas bombas está mediada por un represor (De Kievit y cols., 2001; Jeannot y cols., 2005; Li y cols., 1995). MexEF-OprN necesita de la expresión del alelo funcional de MexT para su activación (Kohler y cols., 1999; Kohler y cols., 1997). A su vez este activador transcripcional podría participar en la regulación de otros genes de la bacteria, de allí que en este trabajo se haya estudiado en profundidad las consecuencias de la expresión del alelo funcional de *mexT*.

En la presente memoria doctoral hemos estudiado el efecto de la sobre-expresión de sistemas MDR sobre la fisiología de la bacteria y su impacto en el *fitness* de *P. aeruginosa*. Para ello hemos analizado los siguientes aspectos: efectos sobre el crecimiento en diferentes medios de cultivo y en experimentos de competición; efectos sobre el perfil global de expresión génica de la bacteria; efectos de la expulsión de moléculas involucradas en *quorum sensing*; efectos sobre la virulencia y finalmente,

analizamos los efectos sobre el metabolismo de generación de energía. En base a estos análisis hemos podido demostrar que cambios en la fisiología del organismo causados por la sobre-expresión de bombas de la familia RND, no necesariamente conllevan a un coste en el *fitness* inespecífico, medido por experimentos clásicos sino que este coste es altamente dependiente del medio en el cual crece el organismo.

### **5.1 La sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN no causa un coste de *fitness* medido en experimentos clásicos de cálculo de velocidad de crecimiento en diferentes medios y en experimentos de competición con otras cepas**

La comparación de la velocidad de crecimiento en monocultivo de la cepa silvestre con la cepa sensible en diferentes medios de cultivo es considerada como una aproximación válida para la estimación del coste de *fitness* (Bjorkman y cols., 1998; Bjorkman y cols., 1999; Nilsson y cols., 2006; Zorzet y cols., 2010). Con este fin las cepas PT149 y PT637 fueron crecidas en medio LB; en medio M63 suplementado con diferentes fuentes de carbono (10 mM de succinato, 10 mM de citrato y 20 mM de piruvato) y en un medio que simula la composición del esputo de pacientes de fibrosis quística, para compararlas con la cepa silvestre. En todos los medios probados, ni PT149, el mutante que expresa constitutivamente la bomba MexEF-OprN debido a la activación del regulador MexT; ni PT637, el mutante que no tiene activa la bomba, pero donde MexT es funcional, no presentaron diferencias sustanciales en su velocidad de crecimiento (Tabla 4.2). Teniendo en cuenta que los experimentos de estimación de la velocidad de crecimiento en monocultivo pueden discriminar diferencias de aproximadamente un 5% (Andersson, 2006), podemos afirmar que ni la sobre-expresión de MexEF-OprN ni la acción de MexT podría causar un coste elevado de *fitness*. Por otra parte, los experimentos de competición mostraron que ni PT149 ni PT637 fueron desplazados del co-cultivo con la cepa silvestre. Como estos experimentos tienen una capacidad de discriminación menores al 1% (Binet y Maurelli, 2005; Bjorkman y cols., 1998; Marcusson y cols., 2009) confirmamos nuestra hipótesis anterior. Con estos resultados podemos afirmar que ni la sobre-expresión de MexEF-OprN, ni la activación de MexT estarían causando un coste en el *fitness* de *P. aeruginosa* en LB.

#### **Discusión**

Se ha demostrado en diferentes estudios que el efecto de la adquisición de resistencia sobre el *fitness* es altamente dependiente de múltiples factores entre los que podemos encontrar las características propias de la cepa, el tipo de bomba y el ambiente en que el mutante sobreproductor se encuentra (Alonso y cols., 2004; Ding y cols., 2008; Guo y cols., 2008; Sanchez y cols., 2002a; Stickland y cols., 2010; Warner y cols., 2008), de allí que la medida del *fitness* sea una estimación relativa y depende de las condiciones del experimento. Para determinar el efecto detallado de la sobre-expresión de las bombas MDR sobre la biología de *P. aeruginosa*, se realizaron estudios de transcriptómica de los mutantes del sistema MexEF-OprN.

### **5.2 Distinción entre los genes cuya regulación depende de MexT de aquellos cuya regulación depende exclusivamente del funcionamiento de la bomba MexEF-OprN**

Como hemos observado, la sobre-expresión de MexEF-OprN no causa un coste en el *fitness* medido por experimentos clásicos en medio LB. Por el contrario, sí genera cambios en la expresión de un gran número de genes en *P. aeruginosa*. Uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue diferenciar los

efectos causados directamente por la acción de la bomba, de aquellos originados por la activación del regulador transcripcional MexT. Se ha descrito en algunos casos que los reguladores de la expresión de sistemas MDR pueden regular también la expresión de otros genes bacterianos independientemente de la actividad de la bomba. Un ejemplo de esta situación es la activación de la bomba AcrAB-TolC de *E. coli*. Esta activación depende de reguladores globales como MarA, RamA o SoxS (Davin-Regli y cols., 2008) que además de regular la expresión de la bomba, influyen en la expresión de un gran número de genes. Dado que se ha descrito que MexT regula la expresión de la porina OprD2, decidimos determinar si este regulador transcripcional regula la expresión de diferentes genes de *P. aeruginosa*, independientemente de la actividad de MexEF-OprN. En este estudio encontramos que los genes que varían su expresión en PT149 y PT637 en todas las fases de crecimiento fueron 8 (Figura 4.2). Como estos genes aparecen en las dos cepas su regulación debería estar mediada por el activador transcripcional MexT.

Durante la realización de esta tesis doctoral se publicaron dos trabajos en los cuales se definen las posibles dianas de MexT basadas en su secuencia de unión al ADN y estableciendo el regulón de este activador transcripcional (Tian y cols., 2009a; Tian y cols., 2009b). De estos 8 genes que cambiaron sus niveles de expresión en nuestros resultados, 6 aparecen en el regulón de Tian, y cols. (2009a) pero sólo 3 presentaron la posible secuencia de unión al ADN: *mexE* (PA2493), *mexS* (PA2491) y la proteína hipotética PA1333. En su publicación, Tian, y cols. (2009a) presentan más de 40 genes regulados por MexT, no obstante este regulón sólo muestra aquellos genes que cambian su expresión en fase exponencial y en un mutante que sobre-expresa MexT en un plásmido, mientras que en el presente trabajo se utilizó un mutante que expresa normalmente el alelo funcional de MexT (PT637). Entre los genes que mostraron una variación de la expresión en todas las condiciones estudiadas podemos destacar PA1001 (*phnA*) y PA1002 (*phnB*), cuya expresión disminuye en los mutantes cuando se compara con la cepa silvestre. Este operón participa en la síntesis de antranilato (Essar y cols., 1990), precursor de la señal de PQS, cuya producción disminuye considerablemente en el mutante PT149 y las implicaciones de este efecto serán discutidas más adelante.

Respecto a los genes que cambian su expresión en fase exponencial encontramos que dos proteínas del SST6 ven disminuida su expresión tanto en PT149 como en PT637 (Figura 4.6), lo que sugiere que MexT está actuando directa o indirectamente en la regulación de este sistema de secreción. Trabajos anteriores han demostrado que la activación de MexT conlleva a una disminución de la producción de elementos del SST3 (Linares y cols., 2005), explicación similar podría tener la disminución de la expresión de componentes del SST6. Con esto podríamos sugerir que la expresión del alelo funcional de MexT trae consigo la disminución de la expresión de los sistemas de ST3 y ST6. Sin embargo, a pesar del papel que tienen estos sistemas de secreción en la virulencia de *P. aeruginosa*, el mutante PT637 no es completamente avirulento en el modelo de infección del nematodo *C. elegans*, mientras que PT149, que sobre-expresa MexEF-OprN, ha perdido por completo su virulencia.

Por otra parte también encontramos que un gran número de genes involucrados en *quorum sensing* cambian su expresión en el mutante PT149, lo que concuerda con trabajos anteriores que han descrito que MexEF-OprN podría expulsar moléculas inductoras de este sistema (Kohler y cols., 2001).

De manera interesante observamos que genes que no están involucrados o que su regulación no depende de *quorum sensing*, cambian su expresión solamente en la cepa PT149. Tanto la cadena respiratoria de nitrato como Fhp, proteína que actúa en el proceso de desintoxicación de NO en

condiciones aeróbicas, aumentan su expresión en esta cepa (Figura 4.4). La hipótesis que se planteó para explicar esta sobre-expresión poco habitual en condiciones aeróbicas, guarda directa relación con el funcionamiento a nivel molecular de la bomba MexEF-OprN. Como toda bomba RND, MexEF-OprN actúa como un antitransportador entre sustrato/H<sup>+</sup> (Nikaido, 2011; Zgurskaya y Nikaido, 1999), la sobre-expresión de este sistema podría traer consigo la acumulación de protones en el citoplasma con una consiguiente acidificación. Esto podría traer problemas al funcionamiento normal de la célula, de allí que sea necesario activar todos los mecanismos necesarios para eliminar los protones. El mecanismo más rápido para eliminar protones del citoplasma es la respiración aeróbica. Esta vía de eliminación de protones podría traer consigo la disminución de la concentración de oxígeno intracelular, y por tanto la activación de vías anaeróbicas de generación de energía.

### 5.3 Efecto de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre los elementos regulados por *Quorum sensing*

Como se mencionó en la introducción, el sistema de *quorum sensing* es un sistema que depende de la densidad poblacional y se activa durante la fase estacionaria de crecimiento. Este sistema funciona fundamentalmente por la producción y acumulación de moléculas autoinductoras (Swift y cols., 2001; von Bodman y cols., 2008; Williams, 2007; Withers y cols., 2001). Estas moléculas tienen la capacidad de activar o reprimir la expresión de genes de *P. aeruginosa* (Williams, 2007).

Trabajos anteriores han demostrado que las bombas MDR pueden expulsar moléculas que participan en *quorum sensing* (Evans y cols., 1998; Maseda y cols., 2004; Mima y Schweizer, 2010; Minagawa y cols., 2012; Sanchez y cols., 2002a). Por ejemplo, la bomba MexAB-OprM puede expulsar diferentes moléculas de homoserin-lactonas (Pearson y cols., 1997). También se ha descrito que la bomba BpeAB-OprB en *Burkholderia pseudomallei* expulsa moléculas tipo acyl-homoserine-lactona (Mima y Schweizer, 2010). En lo que respecta a MexEF-OprN, se ha publicado que su sobre-expresión interfiere con el sistema *rhl* de *quorum sensing*, como consecuencia de una disminución de la concentración de la molécula PQS en el interior de la célula (Kohler y cols., 1997; Ramsey y Whiteley, 2004).

En el análisis del transcriptoma encontramos que de un total de 86 genes que varían su expresión en el mutante PT149 en fase estacionaria, 64 pertenecen al regulón de *quorum sensing* y muchos de ellos son dependientes del sistema *rhl*. De estos 64 genes, 60 disminuyeron su expresión y sólo 4 la aumentaron al ser comparados con la cepa silvestre

Como la regulación de la expresión de la mayoría de los genes cuya expresión disminuye en la cepa PT149 es dependiente de la vía *rhl*, su defecto podría guardar relación con la baja concentración de la señal PQS en el interior de la célula (Kohler y cols., 1997; Ramsey y Whiteley, 2004). Por este motivo se decidió realizar la búsqueda de la molécula que podría estar siendo expulsada por la bomba MexEF-OprN. Utilizando la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) se detectó que en el mutante que sobre-expresa la bomba se produce un retraso en la producción de PQS, ya que esta molécula no apareció ni el sobrenadante ni en el interior de las células durante la fase estacionaria temprana, sin embargo si se detectó tras 14 horas de cultivo, en fase estacionaria tardía (Figura 4.10C). Adicionalmente, esta técnica nos permitió demostrar que los niveles intracelulares de HHQ, otra molécula de señalización de *quorum sensing* que también actúa como precursor de PQS (Dubern y Diggle, 2008) disminuyen. La molécula HHQ se sintetiza a partir de la condensación del antranilato y un beta-cetoácido graso

mediante las enzimas codificadas en el operón *pqsABCDE* (Bredenbruch y cols., 2005; Gallagher y cols., 2002), el cual presenta una disminución de su expresión en la cepa PT149. A su vez, la vía de síntesis de antranilato en medio LB está interconectada con la vía de degradación del triptófano a través de la kinurenina (Farrow y Pesci, 2007). Esta es una de las vías más conservadas de degradación y utilización de L-triptófano en bacterias en condiciones aeróbicas (Kurnasov y cols., 2003). Para analizar si alguno de los componentes de esta vía de degradación está siendo expulsado por MexEF-OprN, se crecieron los mutantes PT149 y PT637 con L-triptófano o con L-kinurenina como única fuente de carbono. PT149 presentó serios problemas de crecimiento al compararlo con la cepa silvestre en presencia de triptófano. Un comportamiento similar tuvo la cepa PT149 cuando la L-kinurenina es la única fuente de carbono, aunque el efecto no fue tan acusado como en el caso del triptófano (Tabla 4.8). Si estos compuestos son expulsados desde el interior de la célula, ésta no tendría posibilidad de utilizarlos, lo que explicaría sus deficiencias en el crecimiento.

Para determinar qué molécula estaba siendo expulsada se analizaron mediante HPLC y espectrometría de masas los sobrenadantes de los cultivos crecidos con triptófano como única fuente de carbono. Los resultados indican que la molécula que está siendo expulsada bajo estas condiciones de cultivo es la L-kinurenina (Figura 4.14).

Para confirmar que la L-kinurenina es la molécula que está siendo expulsada, se clonaron y se expresaron las enzimas que participan en la síntesis de antranilato vía kinurenina (Figura 1.3). La primera de ellas, codificada en el gen *kynA* (PA2579), participa en la transformación de triptófano a N-formil-kinurenina. A pesar de que Kyna está siendo sobre-expresada, no permite la recuperación de los niveles de producción de PQS. Por otra parte, la expresión extra-cromosomal de la enzima que interviene en el siguiente paso, la transformación de N-formil-kinurenina a kinurenina, codificada en el gen *kynB* si permite la recuperación de la producción de PQS (Figura 4.15). Esto indica que la N-formil-kinurenina no está en concentración limitante en el interior celular confirmando de esta forma que la molécula expulsada por MexEF-OprN es la L-kinurenina.

En ausencia de kinurenina no se sintetiza antranilato y el déficit de antranilato no permite la formación de PQS. Esta carencia de PQS podría ser la causa de que los genes regulados por *quorum sensing* disminuyan su expresión. Con el fin de demostrar esta teoría, se suplementó el medio LB con 1 mM de antranilato. Esto nos permitió recuperar la producción de PQS y HHQ (Figura 4.11), así como la expresión del gen *lasB* y los operones *hcnABC*, *pqsABCDE*, *mexGHI* y *phzABCDEFG2* (Figuras 4.12-4.13). Con estas evidencias se puede demostrar que la disminución de la expresión de los genes regulados por *quorum sensing* es debida a la falta de PQS como consecuencia de la expulsión de kinurenina por MexEF-OprN.

Durante la realización de esta tesis doctoral Lamarche y Deziel (2011) publicaron un estudio que demuestra que MexEF-OprN es capaz de expulsar HHQ, lo que provoca un defecto en la producción de PQS. Estos resultados concuerdan con los bajos niveles de HHQ extracelular detectados en la cepa PT149 en nuestro laboratorio e indican que la L-kinurenina no es el único sustrato natural de MexEF-OprN. Los autores de este trabajo (Lamarche y Deziel, 2011) fueron capaces de lograr sólo una recuperación parcial de la producción PQS mediante el suplemento del medio LB con HHQ. Esta recuperación intermedia con HHQ es una fuerte evidencia de que es el antranilato la molécula vital para la síntesis de PQS y que la L-kinurenina al ser expulsada por la bomba, disminuye la concentración del antranilato intracelular.

#### 5.4 Efecto de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre la virulencia de *P. aeruginosa*

La sobre-expresión de las bombas MDR influye directamente sobre la virulencia de los organismos patógenos (Piddock, 2006) ya sea como ventaja en el proceso de colonización (Jerse y cols., 2003; Martínez y Baquero, 2002) o bien en forma perjudicial disminuyendo la virulencia causada por el alto coste en el *fitness* cuando se sobre-expresan (Sanchez y cols., 2002a). Como ya se mencionó anteriormente, nuestro estudio permitió diferenciar los efectos relacionados directamente con la sobre-expresión de la bomba de aquellos debidos tan solo a la expresión del alelo funcional de MexT.

Anteriormente, se mencionó que un gran número de genes regulados por *quorum sensing*, disminuyen su expresión en el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN. Este sistema es fundamental en la virulencia de *P. aeruginosa* (Cao y cols., 2001a; Cao y cols., 2001b; Cosson y cols., 2002; Potvin y cols., 2003; Tan y Ausubel, 2000; Tang y cols., 1996) ya que controla de manera coordinada la expresión de factores de virulencia (Bjarnsholt y Givskov, 2007; Winstanley y Fothergill, 2009). En el presente trabajo se midió la producción de piocianina, la producción de exoproteasas (elastasa y caseinasa) y la producción de hemolisina, cuya regulación depende directamente del sistema de *quorum sensing*. En este caso el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN presentó niveles menores de todos los compuestos evaluados (Tabla 4.6) de allí su posible pérdida de virulencia cuando infecta a *C. elegans*.

La piocianina es un compuesto que pertenece al grupo de las fenazinas y se ha demostrado que como factor de virulencia interviene en el incremento de los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 (Denning y cols., 1998; Leidal y cols., 2001) y en la inducción de la apoptosis en neutrófilos (Allen y cols., 2005; Leidal y cols., 2001). Las propiedades óxido-reductoras de la piocianina la hacen reaccionar con el NAD(P)H de la célula, produciendo un compuesto reducido que al interaccionar con el oxígeno molecular induce la formación de iones superóxido y peróxido de hidrógeno, causando un fuerte estrés oxidativo a la célula. En *P. aeruginosa* los genes que intervienen en la síntesis de este compuesto se codifican en dos operones los cuales se encuentran regulados por el sistema *rhl* (Mavrodi y cols., 2001). Uno de estos operones (*phzABCDEFG2*) disminuye su expresión en el mutante PT149. Por otra parte, la adición de antranilato a los medios de cultivo permite la recuperación de la producción de este compuesto.

Al igual que la piocianina, la producción de elastasa disminuye en el mutante PT149. Esta proteína es una metaloproteasa cuya función principal es romper las uniones intercelulares (*gap-junction*) del epitelio, aumentando la capacidad de invasión tisular de *P. aeruginosa* (Azghani y cols., 2002). La elastasa está codificada en el gen *lasB* cuya expresión disminuye en el mutante PT149 y al igual que la mayoría de los determinantes de virulencia mediados por *quorum sensing* está regulada por el sistema *rhl* (Nouwens y cols., 2003). La recuperación de los niveles de expresión de *lasB* en cultivos con antranilato indican que la falta de PQS podría inhibir la vía *rhl* y por consiguiente todos los genes regulados por la misma.

Cuando se expresa el alelo funcional de MexT, observamos una disminución en la expresión de algunos elementos del SST6. Este sistema de secreción ha sido recientemente descrito y se encuentra ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas (Jani y Cotter, 2010; Schwarz y cols., 2010). Al igual que el SST3 y el SST4 este sistema trasporta las proteínas al hospedero por contacto directo con la



célula eucarionte ((Aschtgen y cols., 2008; Aschtgen y cols., 2010a; Aschtgen y cols., 2010b; Aschtgen y cols., 2012). Las proteínas más estudiadas hasta la fecha del SST6, son las proteínas de exportación Hcp, VgrG y una ATPasa, las cuales son elementos comunes y conservados de todos los SST6 descritos hasta ahora (Alvarez-Martinez y Christie, 2009; Cascales, 2008). En el genoma de *P. aeruginosa* se han descrito tres copias del SST6 codificadas en “islas de patogenicidad”; denominadas HSI-I, HSI-II y HSI-III (por sus siglas en inglés de “*Hcp Secretion Island*”) y su regulación es independiente una de la otra. Mientras HSI-I está regulado transcripcionalmente por el sistema *retS/ladS* (Mougous y cols., 2006), HSI-II y HSI-III están regulados por LasR y MvfR, que son activadores de *quorum sensing* (Lesic y cols., 2009). En el análisis transcripcional se encontró que la proteína de exportación Hcp de las islas HSI-I y HSI-II presentó niveles de expresión inferiores a la cepa silvestre en las cepas PT149 y PT637, por el contrario no se apreciaron cambios en HSI-III. Además, al realizar este análisis mediante RT-PCR en tiempo real se demostró que la proteína Hcp de las tres islas de *P. aeruginosa* disminuían su expresión en PT149 y PT637 respecto a la cepa silvestre (Figura 4.17B). Esto indica que MexT está regulando a este sistema de secreción independientemente de MexEF-OprN, de igual forma a la regulación que ejerce sobre el SST3 (Linares y cols., 2005).

Se ha descrito que los sistemas ST3 y ST6 podrían estar regulados por el complejo *retS/ladS* de *quorum sensing* (Mougous y cols., 2006). Pero en nuestro caso descartamos esa posibilidad ya que al suplementar los cultivos con antranilato, no se logró recuperar la expresión de los SST3 y SST6, confirmando que el papel de MexT en la regulación de estos sistemas es independiente de MexEF-OprN (Figura 4.18).

La capacidad de colonizar al organismo huésped es una medida importante de *fitness* en los organismos patógenos (Bjorkman y cols., 1998; Enne y cols., 2005; Yu y cols., 2005). *P. aeruginosa* es capaz de matar a *C. elegans* ya sea por una infección intestinal (muerte lenta) o bien por una intoxicación (muerte rápida dependiendo del medio en que se encuentre (Mahajan-Miklos y cols., 1999; Ruiz-Diez y cols., 2003; Tan y cols., 1999a). Para determinar la capacidad de colonización de los diferentes mutantes se realizaron ensayos de “muerte lenta” y se analizó la variación de la población de *C. elegans* después de 7 días de co-cultivo. Se pudo observar que PT149 es menos virulento que PT637 y que la cepa silvestre. Como ya mencionamos anteriormente muchos componentes de virulencia regulados por *quorum sensing* y los SST3 y SST6 ven disminuida su producción en PT149. Por otra parte, la cepa PT637 que también presenta una disminución en la expresión de los SST3 y SST6 no presenta una reducción de su virulencia tan acusada como PT149 (Figura 4.19). Estos resultados podrían indicar que la muerte del nematodo esta mediada preferentemente por elementos de virulencia regulados por *quorum sensing*. Estos datos están de acuerdo con estudios previos que muestran que el SST3 no participa en la muerte del nematodo, sin embargo, es fundamental en procesos de infección en mamíferos e insectos (Miyata y cols., 2003). Las evidencias obtenidas en este trabajo sugieren que probablemente el SST6 tampoco estaría participando activamente en la muerte del nematodo, lo que coincide con un estudio anterior donde se describieron todos los componentes de *P. aeruginosa* que podrían participar en la muerte del nematodo. Ningún componente del SST6 parece estar implicado en dicha muerte (Feinbaum y cols., 2012). *P. aeruginosa* produce infecciones agudas e infecciones crónicas. Mientras que en el caso de las infecciones agudas la expresión de todos los factores de virulencia puede ser necesaria, en el caso de las infecciones crónicas no tiene porque ocurrir esto. De hecho, las cepas de *P. aeruginosa* que colonizan durante décadas los pulmones de pacientes con

fibrosis quística, suelen evolucionar hacia la pérdida de virulencia (Folkesson y cols., 2012; Moser y cols., 2009; Rau y cols., 2012). En este sentido cabe la posibilidad de que el mutante que sobre-produce MexEF-OprN pueda estar bien adaptado para mantenerse durante la infección crónica.

### 5.5 *P. aeruginosa* activa la cadena respiratoria de nitrato en el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN

Como se ha indicado previamente los genes codificantes de la cadena respiratoria de nitrato aumentan su expresión en el mutante PT149 en fase exponencial de crecimiento y disminuyen en fase estacionaria en condiciones aeróbicas (Figura 4.20). Se ha descrito que *P. aeruginosa* es capaz de crecer en un medio anaerobio utilizando la cadena respiratoria de nitrato (Williams y cols., 2007a), sin embargo, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio este proceso podría ocurrir en forma aeróbica (Chen y cols., 2006). De esta forma se ha determinado que la respiración por nitrato y la respiración aeróbica pueden realizarse simultáneamente si los rangos de concentración de oxígeno van entre 0 y 2.2 mg/L de O<sub>2</sub>. La hipótesis que presentamos en este trabajo permite explicar que la activación de la cadena respiratoria de nitrato se debe a un funcionamiento superior al fisiológico de MexEF-OprN. Este sistema pertenece a la familia RND de bombas MDR. Estas bombas actúan como antiportadores H<sup>+</sup>/droga (Nikaido, 2011; Zgurskaya y Nikaido, 1999). La incorporación descontrolada de protones al citoplasma bacteriano en el mutante que sobre-produce MexEF-OprN, podría producir una acidificación del interior celular (Zgurskaya y Nikaido, 1999), a menos que se elimine rápidamente el exceso de H<sup>+</sup> para mantener la homeostasis. La forma más rápida de utilizar H<sup>+</sup> por la célula es la respiración de oxígeno (Williams y cols., 2007a); de esta forma la sobre-expresión de MexEF-OprN debería aumentar el consumo de oxígeno de la célula causando una disminución del oxígeno intracelular. Esta disminución de oxígeno puede activar la expresión de vías de generación de energía que normalmente no se expresan en condiciones aeróbicas. Una de ellas es la cadena respiratoria de nitrato. Se ha descrito que la activación de la cadena respiratoria de nitrato podría estar asociada con la baja producción de moléculas del tipo N-acil-N-homoserin lactonas (Toyofuku y cols., 2007). Para descartar la posibilidad de que la respiración de nitrato se encuentre activa por las deficiencias en el sistema de *quorum sensing* presentadas por la cepa PT149, se midió la expresión de los genes que participan en esta vía, en medio suplementado con antranilato. Encontramos que no hubo diferencias en la expresión de estos genes cuando se crecieron las cepas en el medio suplementado y sin suplementar. Esto nos sugiere que se trata de una característica propia del funcionamiento descontrolado de la bomba y no de su defecto sobre *quorum sensing*.

La activación de la cadena respiratoria de nitrato genera la producción de óxido nítrico, compuesto tóxico para la célula, más aún en condiciones aeróbicas (Arai y cols., 2005; Arai y cols., 1995). No obstante, este compuesto también participa en procesos fundamentales de la fisiología de la célula (Cooper, 1999). El NO producido es inmediatamente reducido a N<sub>2</sub>O mediante la NO reductasa (Operón *nor*). Este proceso utiliza el NO como último aceptor de electrones en la respiración anaeróbica (Arai y cols., 2005). En el análisis del transcriptoma se pudo apreciar que, aparte de los genes que participan normalmente en la cadena respiratoria de nitrato, la proteína encargada de la desintoxicación de óxido nítrico en condiciones aeróbicas Fhp, aumenta su expresión en la cepa PT149. Esta proteína actúa como NO dioxigenasa en condiciones aerobias y como NO reductasa en condiciones anaerobias (Poole y Hughes, 2000). Para comprobar el efecto del NO en PT149, los mutantes fueron tratados con dos



donadores de NO, nitroprusiato de sodio (SNP) y S-nitroglutation (GSNO). Al determinar la CMI para estos compuestos encontramos que la cepa PT149 es mucho más sensible a ambos, a pesar de que los elementos que participan en la desintoxicación aumentan su expresión (operón *nor* y la proteína Fhp). El NO inhibe la capacidad que tienen las oxidasas terminales para captar el oxígeno ya que compete con este gas por los grupos Hemo de estas proteínas (Brown y cols., 1997). Normalmente, ante la presencia de NO aumenta la expresión de los elementos involucrados en la desintoxicación de este gas (Arai y cols., 2005). A pesar de ello, como se mencionó anteriormente aunque PT149 sobre-expresa estos elementos de desintoxicación es también más sensible al NO. Una de las posibles explicaciones es que aunque el mutante tenga activados los mecanismos de desintoxicación, estos no son suficientes para contrarrestar los efectos de grandes concentraciones de NO producidas en presencia de SNP y GSNO. Por otra parte, se ha descrito también que la acción de estos compuestos puede activar diferencialmente la expresión de algunas oxidasas terminales en *P. aeruginosa*. Es así como el SNP activa los genes de la oxidasa terminal CIO (Comolli y Donohue, 2004; Cooper y cols., 2003; Kawakami y cols., 2010) y el GSNO a la oxidasa CYO (Kawakami y cols., 2010). Para explorar esta posibilidad se midió la expresión de estas oxidasas en PT149 cultivada en medio LB con SNP y GSNO de forma independiente. Los resultados mostraron que ninguna de estas oxidasas aumenta su expresión en estas condiciones, esto podría explicar la alta sensibilidad a SNP y GSNO presentada por la cepa PT149 ya que estas oxidasas actúan como primera barrera de protección contra el NO (Figura 4.21).

Una vez descrito este fenómeno en el mutante que sobre-expresa la bomba MexEF-OprN, analizamos si otros mutantes que sobre-expresan bombas tipo RND en *P. aeruginosa*, presentaban el mismo comportamiento. Para ello se midió la expresión de los genes de la cadena respiratoria de nitrato y de *fhp* en los mutantes que sobre-expresan MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY. En todos ellos aparece aumentada su expresión lo que confirma nuestra teoría (Figura 4.22). Estos mismos mutantes fueron sometidos a diferentes concentraciones de SNP y GSNO, con resultados similares a los obtenidos en MexEF-OprN. Teniendo en cuenta estos resultados y para determinar si ésta es una característica común de todas las bombas tipo RND, se obtuvo un mutante de *E. coli* que sobre-expresa la bomba AcrAB-TolC, modelo en el estudio de las bombas RND (Nikaido, 2011). A diferencia de *P. aeruginosa*, *E. coli* no presenta la cadena respiratoria de nitrato completa. No obstante, puede utilizar nitrato o nitrito como aceptores de electrones bajo condiciones anaeróbicas o microaeróbicas generando grandes cantidades de NO (Corker y Poole, 2003). Debido a que la cadena respiratoria de nitrato no está presente en este organismo, la desintoxicación de NO, no es muy eficiente ya que *E. coli* sólo cuenta con una proteína homóloga a la Fhp de *P. aeruginosa*, denominada Hmp, que cumple esta función (Corker y Poole, 2003). Observamos que la expresión de uno de los genes que participa en la asimilación de nitrito *nfrC* y el de la proteína encargada de la desintoxicación de NO, *hmp*, aumenta en el mutante que sobre-expresa AcrAB-TolC. También se determinó para este mutante la CMI de SNP y al igual que los mutantes que sobre-expresan bombas en *P. aeruginosa*, el mutante que sobre-expresa AcrAB-TolC es mucho más sensible a este compuesto.

Una de las grandes diferencias que presenta el mutante que sobre-produce AcrAB-TolC, comparado con los mutantes de *P. aeruginosa*, es que sí presenta coste de *fitness* cuando se mide la velocidad de crecimiento en monocultivo. Esto podría guardar relación con que *E. coli* al no tener cadena respiratoria de nitrato completa (Corker y Poole, 2003), podría ser más susceptible a la producción de NO endógeno causado por la activación de las vías de asimilación de nitrato y/o nitrito

(Ji y Hollocher, 1988a, b), cuando sobre-expresa AcrAB-TolC en condiciones aerobias.

Hemos demostrado por tanto que la activación de vías alternativas de generación de energía en condiciones aeróbicas, como es el caso de la cadena respiratoria de nitrato, podría ser una solución viable para compensar la baja producción de energía generada por la disminución del oxígeno intracelular causada por la sobre-expresión de una bomba de la familia RND, evitando así el coste de *fitness*.

## 5.6 Efecto sobre el consumo de oxígeno de la sobre-expresión de las bombas de la familia RND.

Como se mencionó anteriormente la solución más rápida y eficiente para eliminar el exceso de protones desde el citoplasma es la respiración aeróbica (Williams y cols., 2007a). Ante esta situación los mutantes que sobre-expresan bombas de la familia RND deberían consumir más oxígeno que su respectiva cepa silvestre. Para evaluar esta posibilidad se midió la velocidad de consumo de oxígeno de los mutantes y todos ellos presentaron un consumo mayor que la cepa silvestre bajo las mismas condiciones de crecimiento, siendo el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN el que más oxígeno consumió en comparación con la cepa silvestre. Al correlacionar los niveles de consumo de oxígeno con los niveles de expresión de cada una de las bombas en sus respectivos mutantes se encontró que esta relación es directamente proporcional; el mutante que presenta mayores niveles de expresión de la bomba consume más oxígeno.

A partir de estos resultados se decidió analizar el comportamiento del mutante MexEF-OprN en un ambiente constantemente aireado. Para ello PT149, PT637 y su respectiva cepa silvestre fueron crecidos en un fermentador con dos condiciones diferentes; (i) con burbujeo constante de oxígeno y (ii) constantemente agitado pero sin burbujeo de oxígeno (situación que se asemeja a las condiciones del matraz en fase exponencial de crecimiento). Adicionalmente, se determinaron los niveles de expresión de los diferentes componentes de la bomba en ambas condiciones. Se encontró que los niveles de expresión de la bomba en condiciones de aireación son muy superiores a las condiciones de no aireación (Figura 4.25), que presentó niveles muy similares a los vistos en el crecimiento en matraz. Este resultado se contrapone al trabajo de Schaible, y cols. (2012) que afirma que bajo condiciones de hipoxia aumenta la resistencia a los antibióticos y la explicación que se plantea es el aumento de la expresión de las bombas RND. En la presente tesis se propone que la expresión de estos sistemas depende de la concentración de oxígeno, lo que sugiere que en ambientes con baja disponibilidad de este elemento disminuiría la resistencia a los antibióticos debido a los bajos niveles de expresión presentados por estas bombas. Aunque en este trabajo no se midió el cambio en la sensibilidad de los antibióticos en condiciones de aireación, si se puede argumentar que el incremento en la expresión de estos genes podría aumentar la resistencia a los antibióticos (Lomovskaya y cols., 2001; Saito y cols., 1999; Wolter y cols., 2004).

Si la activación de la cadena respiratoria de nitrato en los mutantes que sobre-expresan bombas de la familia RND es causada por cantidades de oxígeno insuficientes, la adición constante de este gas debería devolver estos niveles de expresión y hacerlos similares a los de la cepa silvestre. Para comprobar esta hipótesis se midió la expresión de los genes de respiración de nitrato en cultivos suplementados con oxígeno, observando que los genes de esta vía recuperan los niveles de expresión presentados por la cepa silvestre (Figura 4.27).

Al analizar los cultivos no aireados la saturación de oxígeno en fase logarítmica llega a un 5%, a diferencia del 80% presentado por los cultivos aireados. Este 5% todavía no es considerado microanaerobiosis ya que este estado fisiológico comienza cuando la saturación de oxígeno es de alrededor de un 1% (Arai y cols., 1995; Chen y cols., 2006). En condiciones de no aireación aumenta la expresión de los genes involucrados en la cadena respiratoria de nitrato. Para analizar si los cultivos se encontraban en un estado fisiológico de microaerobiosis medimos la expresión de tres genes que codifican proteínas involucradas en este proceso: los activadores transcripcionales ANR y DNR por una parte y la oxidasa terminal Cbb<sub>3</sub>-2 por otra. ANR es la proteína que actúa como regulador global de la expresión de genes en condiciones de baja concentración de oxígeno y de la anaerobiosis. Esta proteína activa el funcionamiento de la cadena respiratoria de nitrato (Arai y cols., 1995; Ye y cols., 1995), la vía de la arginina deimasa y la producción de ácido cianhídrico (Trunk y cols., 2010; Zimmermann y cols., 1991). ANR es capaz de sensor la concentración de oxígeno intracelular mediante cuatro residuos de cisteína, siendo mucho más sensible a este gas en condiciones de anoxia (Spiro, 1994). Por otra parte DNR es la proteína encargada de activar directamente a los genes de la cadena respiratoria de nitrato, previa activación por parte de ANR (Arai y cols., 1997; Arai y cols., 2003). A su vez Cbb<sub>3</sub>-2 es una oxidasa de alta afinidad que aumenta su expresión cuando la concentración de oxígeno baja de un 2% (Alvarez-Ortega y Harwood, 2007). Con excepción de DNR todos estos genes aumentaron su expresión en el mutante PT149 en los cultivos no aireados, lo que nos lleva a pensar que si bien en el medio no existe una condición de microaerobiosis, si lo existe en el interior de la célula. Un resultado inesperado en este caso es la no variación de la expresión de DNR en la cepa PT149. Se ha descrito que DNR es fundamental para la activación del proceso de la cadena respiratoria de nitrato (Arai y cols., 1997), sin embargo, estudios recientes han demostrado que ANR por si sólo también podría activar esta vía, sin necesitar de la presencia de DNR ya que este último no puede medir la concentración de oxígeno intracelular (Trunk y cols., 2010).

Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de la bomba MexEF-OprN podría disminuir la concentración del oxígeno intracelular. En este fenómeno MexT no tiene ningún papel independiente ya que el mutante PT637 se comporta de manera idéntica a la cepa silvestre.

## 5.7 El consumo de nitrato desde el medio LB sugiere que este elemento puede influir en el *fitness* de mutantes que sobre-expresan bombas de la familia RND

La activación de la cadena respiratoria de nitrato requiere de dos condiciones fundamentales (i) baja concentración de oxígeno y (ii) presencia de nitrato/nitrito en el medio (Berks y cols., 1995; Chen y cols., 2006; Zumft, 1997). Si bien en medio LB no se ha descrito hasta ahora la presencia de nitrato, en este trabajo hemos estimado la concentración de este compuesto en aproximadamente 15 µM, concentración suficiente para permitir la activación de la cadena respiratoria de nitrato. Como era de esperar, el mutante que sobre-expresa MexEF-OprN (PT149) consume más nitrato si se compara con la cepa silvestre o con la cepa PT637. De hecho, este mutante consume todo el nitrato disponible en el medio LB después de 24 horas de crecimiento (Figura 4.31A). Por otra parte, el resto de los mutantes que sobre-expresan bombas RND, consumen el nitrato en función de los niveles de expresión de su respectiva bomba. Al igual que el consumo de oxígeno, el consumo de nitrato se correlaciona con los niveles de expresión de estos sistemas MDR.

Como ya se mencionó anteriormente la activación de la cadena respiratoria de nitrato genera

la producción de óxido nítrico, elemento tóxico para la célula (Arai y cols., 2005; Arai y cols., 1995). Al medir la producción de este compuesto en todos los mutantes que sobre-expresan bombas RND, vemos que su producción es mayor si se compara con la cepa silvestre y depende de los niveles de expresión de la bomba (Figura 4.30). De esta forma, podemos decir que el consumo de oxígeno y nitrato y la producción de NO depende de los niveles de expresión de la bomba lo que confirma las observaciones realizadas en este trabajo.

Para evaluar el efecto del nitrato sobre el *fitness* se determinó la velocidad de crecimiento de las diferentes cepas en medio LB carente de nitrato. El resultado muestra que el mutante PT149 crece a una velocidad menor en este medio en comparación con las cepas: silvestre, PT637 y PT149 $\Delta$ nirS. Para comprobar que es la falta de nitrato la que provoca esta deficiencia en el *fitness*, se añadió al medio KNO<sub>3</sub> a una concentración final de 20  $\mu$ M. Esto permitió que la cepa PT149 recupere la velocidad de crecimiento similar a la mostrada por la cepa silvestre y los otros mutantes evaluados. Estos resultados confirman que la presencia de nitrato es fundamental, para activar la cadena respiratoria de nitrato y así evitar el coste en el *fitness*.

Para determinar el coste de *fitness* con mayor precisión se realizaron experimentos de competición en medio carente de nitrato entre la cepa PT149 y la cepa silvestre. Transcurridos tres días de cultivo PT149 es totalmente desplazado del medio. Este resultado refuerza la idea que la presencia de nitrato en el medio es necesaria para evitar el coste de *fitness* provocado por la sobre-expresión de MexEF-OprN.

En esta tesis doctoral hemos demostrado que la adquisición de un mecanismo de resistencia a los antibióticos no siempre genera un coste inespecífico de *fitness* en el organismo sino más bien cambios en la fisiología de la bacteria los cuales pueden causar un coste en el *fitness* dependiendo de las condiciones iniciales del sistema.

## CONCLUSIONES

---



## 6 Conclusiones

La sobre-expresión del sistema MexEF-OprN no causa un coste en el *fitness* de *P. aeruginosa* cuando se analiza mediante experimentos de competición en medio rico. Esto indica que la adquisición de resistencia no siempre produce un coste inespecífico en la eficacia biológica del organismo.

El sustrato metabólico natural de MexEF-OprN es L-kinurenina, un intermediario de la síntesis de la señal de *quorum sensing* PQS. Como consecuencia de dicha expulsión, la sobre-expresión de MexEF-OprN conlleva a un retraso en la producción de PQS y por tanto a una disminución de la expresión de los genes regulados por *quorum sensing*.

La expresión de los sistemas de ST3 y ST6 está regulada por la proteína MexT de manera independiente del funcionamiento de la bomba MexEF-OprN.

La pérdida de virulencia del mutante que sobre-expresa MexEF-OprN en el modelo de infección de *C. elegans* depende esencialmente del efecto de la actividad de la bomba sobre la regulación de virulencia mediada por *quorum sensing*. El efecto de la actividad de MexT, como regulador de los SST3 y SST6, en la virulencia de *P. aeruginosa* es muy limitado.

La sobre-expresión de diferentes bombas de la familia RND, genera en *P. aeruginosa* y en *E. coli* un aumento en el consumo de oxígeno y una activación de la cadena respiratoria de nitrato, probablemente como respuesta al exceso de H<sup>+</sup> en el citoplasma de la célula.

La activación de la cadena respiratoria de nitrato en condiciones aeróbicas es una vía alternativa de generación de energía que utiliza la bacteria para evitar el coste de *fitness* generado por la sobre-expresión de bombas de la familia RND. En este contexto la presencia de nitrato en el medio es fundamental para la activación de esta cadena.

El consumo de oxígeno y nitrato y la producción de óxido nítrico es directamente proporcional a los niveles de expresión de una determinada bomba RND.





## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## 7 Bibliografía

1. **Aballay A, Ausubel FM.** 2002. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **5**:97-101.
2. **Aendekerk S, Diggle SP, Song Z, Hoiby N, Cornelis P, Williams P, Camara M.** 2005. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* **151**:1113-1125.
3. **Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C.** 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* **148**:2371-2381.
4. **Aires JR, Kohler T, Nikaido H, Plesiat P.** 1999. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:2624-2628.
5. **Alonso A, Morales G, Escalante R, Campanario E, Sastre L, Martinez JL.** 2004. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* **53**:432-434.
6. **Alvarez-Martinez CE, Christie PJ.** 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **73**:775-808.
7. **Alvarez-Ortega C, Harwood CS.** 2007. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Molecular microbiology* **65**:153-165.
8. **Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock RE, Martinez JL.** 2010. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:4159-4167.
9. **Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J.** 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews. Microbiology* **8**:251-259.
10. **Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MK.** 2005. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* **174**:3643-3649.
11. **Andersson DI.** 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**:452-456.
12. **Andersson DI.** 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* **9**:461-465.
13. **Andersson DI, Hughes D.** 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature reviews. Microbiology* **8**:260-271.
14. **Andersson DI, Levin BR.** 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **2**:489-493.
15. **Arai H.** 2011. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology* **2**:103.
16. **Arai H, Hayashi M, Kuroi A, Ishii M, Igarashi Y.** 2005. Transcriptional regulation of the flavohemoglobin gene for aerobic nitric oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**:3960-3968.
17. **Arai H, Igarashi Y, Kodama T.** 1991a. Anaerobically induced expression of the nitrite reductase cytochrome c-551 operon from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS letters* **280**:351-353.
18. **Arai H, Igarashi Y, Kodama T.** 1991b. Nitrite activates the transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase and cytochrome c-551 operon under anaerobic conditions. *FEBS letters* **288**:227-228.
19. **Arai H, Igarashi Y, Kodama T.** 1994. Structure and ANR-dependent transcription of the nir genes for denitrification from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **58**:1286-1291.

20. **Arai H, Igarashi Y, Kodama T.** 1995. Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEBS letters* **371**:73-76.
21. **Arai H, Kodama T, Igarashi Y.** 1997. Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **25**:1141-1148.
22. **Arai H, Kodama T, Igarashi Y.** 1999. Effect of nitrogen oxides on expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters* **170**:19-24.
23. **Arai H, Mizutani M, Igarashi Y.** 2003. Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**:29-36.
24. **Arai H, Sanbongi Y, Igarashi Y, Kodama T.** 1990. Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c-551 from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS letters* **261**:196-198.
25. **Aschtgen MS, Bernard CS, De Bentzmann S, Lloubes R, Cascales E.** 2008. SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**:7523-7531.
26. **Aschtgen MS, Gavioli M, Dessen A, Lloubes R, Cascales E.** 2010a. The SciZ protein anchors the enteroaggregative *Escherichia coli* Type VI secretion system to the cell wall. *Molecular microbiology* **75**:886-899.
27. **Aschtgen MS, Thomas MS, Cascales E.** 2010b. Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP... what else? *Virulence* **1**:535-540.
28. **Aschtgen MS, Zoued A, Lloubes R, Journet L, Cascales E.** 2012. The C-tail anchored TssL subunit, an essential protein of the enteroaggregative *Escherichia coli* Sci-1 Type VI secretion system, is inserted by YidC. *MicrobiologyOpen* **1**:71-82.
29. **Atlas RM.** 1993. *Handbook of Microbiological Media*
30. **Azghani AO, Baker JW, Shetty S, Miller EJ, Bhat GJ.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* **51**:506-510.
31. **Baquero F, Martinez JL, Canton R.** 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* **19**:260-265.
32. **Benitez JA, Silva AJ, Finkelstein RA.** 2001. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* **69**:6549-6553.
33. **Benkert B, Quack N, Schreiber K, Jaensch L, Jahn D, Schobert M.** 2008. Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation arcDABC operon. *Microbiology* **154**:3053-3060.
34. **Berks BC, Ferguson SJ, Moir JW, Richardson DJ.** 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta* **1232**:97-173.
35. **Binet R, Maurelli AT.** 2005. Fitness cost due to mutations in the 16S rRNA associated with spectinomycin resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4455-4464.
36. **Bjarnsholt T, Givskov M.** 2007. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical and bioanalytical chemistry* **387**:409-414.
37. **Bjorkman J, Hughes D, Andersson DI.** 1998. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3949-3953.
38. **Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI.** 2000. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science* **287**:1479-1482.
39. **Bjorkman J, Samuelsson P, Andersson DI, Hughes D.** 1999. Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology* **31**:53-58.
40. **Blair JM, Piddock LJ.** 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol* **12**:512-519.

41. **Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1462.
42. **Botzenhart K, Döring G.** 1993. Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, p. 1-18. In Campa M, Bendinelli M, Friedman H (ed.), *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen Plenum Press, New York.
43. **Bouma JE, Lenski RE.** 1988. Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature* **335**:351-352.
44. **Boutoille D, Jacqueline C, Le Mabecque V, Potel G, Caillon J.** 2009. In vivo impact of the MexAB-OprM efflux system on beta-lactam efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *International journal of antimicrobial agents* **33**:417-420.
45. **Brandt U, Trumpower B.** 1994. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **29**:165-197.
46. **Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, Morr M, Muller R, Haussler S.** 2005. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *J Bacteriol* **187**:3630-3635.
47. **Brenner S.** 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**:71-94.
48. **Brown GC, McBride AG, Fox EJ, McNaught KS, Borutaite V.** 1997. Nitric oxide and oxygen metabolism. *Biochemical Society transactions* **25**:901-904.
49. **Busch A, Friedrich B, Cramm R.** 2002. Characterization of the *norB* gene, encoding nitric oxide reductase, in the nondenitrifying cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl Environ Microbiol* **68**:668-672.
50. **Buyck JM, Guenard S, Plesiat P, Tulkens PM, Van Bambeke F.** 2012. Role of MexAB-OprM in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to temocillin and impact on the susceptibility of strains isolated from patients suffering from cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* **67**:771-775.
51. **Cabello FC.** 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* **8**:1137-1144.
52. **Caille O, Rossier C, Perron K.** 2007. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**:4561-4568.
53. **Calfee MW, Coleman JP, Pesci EC.** 2001. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11633-11637.
54. **Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC.** 2009. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews* **22**:291-321, Table of Contents.
55. **Canton R, Coque TM.** 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**:466-475.
56. **Cao H, Baldini RL, Rahme LG.** 2001a. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol* **39**:259-284.
57. **Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme LG.** 2001b. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14613-14618.
58. **Cascales E.** 2008. The type VI secretion toolkit. *EMBO reports* **9**:735-741.
59. **Ciofu O, Mandsberg LF, Wang H, Hoiby N.** 2012. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *FEMS immunology and medical microbiology* **65**:215-225.
60. **Collier DN, Anderson L, McKnight SL, Noah TL, Knowles M, Boucher R, Schwab U, Gilligan P, Pesci EC.** 2002. A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS microbiology letters* **215**:41-46.
61. **Comolli JC, Donohue TJ.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Molecular microbiology* **45**:755-768.

62. **Comolli JC, Donohue TJ.** 2004. Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* cbb<sub>3</sub> cytochrome oxidases. *Molecular microbiology* **51**:1193-1203.
63. **Cooper CE.** 1999. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta* **1411**:290-309.
64. **Cooper M, Tavankar GR, Williams HD.** 2003. Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**:1275-1284.
65. **Corker H, Poole RK.** 2003. Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. Dependence on nitrite reductase, the NO-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. *The Journal of biological chemistry* **278**:31584-31592.
66. **Cornforth JW, James AT.** 1956. Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin. *The Biochemical journal* **63**:124-130.
67. **Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, Van Delden C, Curty LK, Kohler T.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* **184**:3027-3033.
68. **Couzigou C, Joly C.** 2002. French nosocomial infection survey CCLIN Paris-Nord Mars.
69. **Cox CD.** 1986. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infection and immunity* **52**:263-270.
70. **Cramm R, Pohlmann A, Friedrich B.** 1999. Purification and characterization of the single-component nitric oxide reductase from *Ralstonia eutropha* H16. *FEBS letters* **460**:6-10.
71. **Crofts AR.** 2004. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annual review of physiology* **66**:689-733.
72. **Crofts AR, Berry EA.** 1998. Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Current opinion in structural biology* **8**:501-509.
73. **Cunningham L, Pitt M, Williams HD.** 1997. The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome bd quinol oxidases. *Molecular microbiology* **24**:579-591.
74. **Cunningham L, Williams HD.** 1995. Isolation and characterization of mutants defective in the cyanide-insensitive respiratory pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **177**:432-438.
75. **Chen F, Xia Q, Ju LK.** 2006. Competition between oxygen and nitrate respirations in continuous culture of *Pseudomonas aeruginosa* performing aerobic denitrification. *Biotechnology and bioengineering* **93**:1069-1078.
76. **Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP.** 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:428-432.
77. **Chuanchuen R, Murata T, Gotoh N, Schweizer HP.** 2005. Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2133-2136.
78. **Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP.** 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol* **184**:5036-5044.
79. **Chung YJ, Saier MH, Jr.** 2001. SMR-type multidrug resistance pumps. *Current opinion in drug discovery & development* **4**:237-245.
80. **D'Costa VM, Griffiths E, Wright GD.** 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr Opin Microbiol* **10**:481-489.
81. **Dacheux D, Goure J, Chabert J, Usson Y, Attree I.** 2001. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Molecular microbiology* **40**:76-85.
82. **Darby C, Cosma CL, Thomas JH, Manoil C.** 1999. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:15202-15207.
83. **Davies J.** 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**:375-382.



84. **Davies KJ, Lloyd D, Boddy L.** 1989. The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of general microbiology* **135**:2445-2451.
85. **Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E, Molitor A, Pages JM.** 2008. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Current drug targets* **9**:750-759.
86. **de Kievit TR, Iglewski BH.** 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and immunity* **68**:4839-4849.
87. **De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DG.** 2001. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1761-1770.
88. **Denning GM, Wollenweber LA, Railsback MA, Cox CD, Stoll LL, Britigan BE.** 1998. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infection and immunity* **66**:5777-5784.
89. **Deziel E, Lepine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG, Rahme LG.** 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1339-1344.
90. **Dieppois G, Ducret V, Caille O, Perron K.** 2012. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one* **7**:e38148.
91. **Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Camara M.** 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**:2576-2586.
92. **Ding Y, Onodera Y, Lee JC, Hooper DC.** 2008. NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *J Bacteriol* **190**:7123-7129.
93. **Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH.** 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**:351-368.
94. **Dubern JF, Diggle SP.** 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular bioSystems* **4**:882-888.
95. **Eberhard A.** 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol* **109**:1101-1105.
96. **Enne VI, Delsol AA, Davis GR, Hayward SL, Roe JM, Bennett PM.** 2005. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J Antimicrob Chemother* **56**:544-551.
97. **Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, Schobert M.** 2004. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* **186**:4596-4604.
98. **Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP.** 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* **172**:884-900.
99. **Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Poole K.** 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**:5443-5447.
100. **Fajardo A, Martinez-Martin N, Mercadillo M, Galan JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tummler B, Baquero F, Martinez JL.** 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PloS one* **3**:e1619.
101. **Farrow JM 3rd, Pesci EC.** 2007. Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol* **189**:3425-3433.
102. **Favero MS, Carson LA, Bond WW, Petersen NJ.** 1971. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* **173**:836-838.
103. **Feinbaum RL, Urbach JM, Liberati NT, Djonovic S, Adonizio A, Carvunis AR, Ausubel FM.** 2012. Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *PLoS pathogens* **8**:e1002813.

104. **Fernandez L, Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Kocincova D, Lam JS, Martinez JL, Hancock RE.** 2013. Characterization of the polymyxin B resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:110-119.
105. **Fletcher MP, Diggle SP, Camara M, Williams P.** 2007. Biosensor-based assays for PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules. *Nature protocols* **2**:1254-1262.
106. **Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, Molin S.** 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature reviews. Microbiology* **10**:841-851.
107. **Fujiwara T, Fukumori Y, Yamanaka T.** 1992. A novel terminal oxidase, cytochrome baa3 purified from aerobically grown *Pseudomonas aeruginosa*: it shows a clear difference between resting state and pulsed state. *Journal of biochemistry* **112**:290-298.
108. **Fukuoka T, Ohya S, Narita T, Katsuta M, Iijima M, Masuda N, Yasuda H, Trias J, Nikaido H.** 1993. Activity of the carbapenem panipenem and role of the OprD (D2) protein in its diffusion through the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:322-327.
109. **Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**:727-751.
110. **Gallagher LA, Manoil C.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol* **183**:6207-6214.
111. **Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C.** 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**:6472-6480.
112. **Galloway DR.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Molecular microbiology* **5**:2315-2321.
113. **Gambello MJ, Iglewski BH.** 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* **173**:3000-3009.
114. **Gamper M, Zimmermann A, Haas D.** 1991. Anaerobic regulation of transcription initiation in the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**:4742-4750.
115. **Gaynes R, Edwards JR.** 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* **41**:848-854.
116. **Ghosh S, Cremers CM, Jakob U, Love NG.** 2011. Chlorinated phenols control the expression of the multidrug resistance efflux pump MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with NalC. *Molecular microbiology* **79**:1547-1556.
117. **Ghuysen JM.** 1994. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends in microbiology* **2**:372-380.
118. **Ghuysen JM.** 1997. Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes. *International journal of antimicrobial agents* **8**:45-60.
119. **Gillespie SH, Basu S, Dickens AL, O'Sullivan DM, McHugh TD.** 2005. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J Antimicrob Chemother* **56**:344-348.
120. **Gomez-Gomez JM, Blazquez J, Baquero F, Martinez JL.** 1996. Hns mutant unveils the presence of a latent haemolytic activity in *Escherichia coli* K-12. *Molecular microbiology* **19**:909-910.
121. **Gotoh N, Tsujimoto H, Nomura A, Okamoto K, Tsuda M, Nishino T.** 1998. Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters* **165**:21-27.
122. **Govan JR, Deretic V.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological reviews* **60**:539-574.
123. **Greally P, Whitaker P, Peckham D.** 2012. Challenges with current inhaled treatments for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *Current medical research and opinion* **28**:1059-1067.
124. **Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SK, Vitanza-jack VB.** 1974. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology* **28**:987-991.



125. **Grkovic S, Brown MH, Skurray RA.** 2001. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* **12**:225-237.
126. **Grkovic S, Brown MH, Skurray RA.** 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **66**:671-701, table of contents.
127. **Guay DR.** 2008. Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs* **68**:1169-1205.
128. **Guo B, Wang Y, Shi F, Barton YW, Plummer P, Reynolds DL, Nettleton D, Grinnage-Pulley T, Lin J, Zhang Q.** 2008. CmeR functions as a pleiotropic regulator and is required for optimal colonization of *Campylobacter jejuni* in vivo. *J Bacteriol* **190**:1879-1890.
129. **Handel A, Regoes RR, Antia R.** 2006. The role of compensatory mutations in the emergence of drug resistance. *PLoS computational biology* **2**:e137.
130. **Hasegawa N, Arai H, Igarashi Y.** 2001. Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the nir gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase. *Biochemical and biophysical research communications* **288**:1223-1230.
131. **Hasegawa N, Arai H, Igarashi Y.** 2003. Need for cytochrome bc1 complex for dissimilatory nitrite reduction of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **67**:121-126.
132. **Hendriks J, Oubrie A, Castresana J, Urbani A, Gemeinhardt S, Saraste M.** 2000. Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1459**:266-273.
133. **Hernandez A, Mate MJ, Sanchez-Diaz PC, Romero A, Rojo F, Martinez JL.** 2009. Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *The Journal of biological chemistry* **284**:14428-14438.
134. **Hernandez A, Ruiz FM, Romero A, Martinez JL.** 2011. The binding of triclosan to SmeT, the repressor of the multidrug efflux pump SmeDEF, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS pathogens* **7**:e1002103.
135. **Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, Kamihiro S, Hancock RE, Speert DP.** 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of experimental medicine* **196**:109-118.
136. **Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP.** 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**:77-86.
137. **Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plesiat P.** 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1371-1375.
138. **Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S.** 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Hensyl, WD (edit). Baltimore: Williams & Wilkins **71-101**.
139. **Householder TC, Fozo EM, Cardinale JA, Clark VL.** 2000. Gonococcal nitric oxide reductase is encoded by a single gene, *norB*, which is required for anaerobic growth and is induced by nitric oxide. *Infection and immunity* **68**:5241-5246.
140. **Hu X, Zhou Q, Luo Y.** 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environ Pollut.*
141. **Hughes D, Andersson DI.** 2012. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol.*
142. **Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A.** 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3045-3049.
143. **Jani AJ, Cotter PA.** 2010. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell host & microbe* **8**:2-6.
144. **Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, van Delden C, Plesiat P.** 2008. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2455-2462.

145. **Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plesiat P.** 2005. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* **187**:5341-5346.
146. **Jerse AE, Sharma ND, Simms AN, Crow ET, Snyder LA, Shafer WM.** 2003. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infection and immunity* **71**:5576-5582.
147. **Ji XB, Hollocher TC.** 1988a. Mechanism for nitrosation of 2,3-diaminonaphthalene by *Escherichia coli*: enzymatic production of NO followed by O<sub>2</sub>-dependent chemical nitrosation. *Appl Environ Microbiol* **54**:1791-1794.
148. **Ji XB, Hollocher TC.** 1988b. Reduction of nitrite to nitric oxide by enteric bacteria. *Biochemical and biophysical research communications* **157**:106-108.
149. **Jin Y, Yang H, Qiao M, Jin S.** 2011. MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**:399-410.
150. **Kakishima K, Shiratsuchi A, Taoka A, Nakanishi Y, Fukumori Y.** 2007. Participation of nitric oxide reductase in survival of *Pseudomonas aeruginosa* in LPS-activated macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* **355**:587-591.
151. **Kawakami T, Kuroki M, Ishii M, Igarashi Y, Arai H.** 2010. Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **12**:1399-1412.
152. **Kohler T, Epp SF, Curty LK, Pechere JC.** 1999. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**:6300-6305.
153. **Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechere JC.** 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **23**:345-354.
154. **Kohler T, van Delden C, Curty LK, Hamzehpour MM, Pechere JC.** 2001. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:5213-5222.
155. **Kondo A, Hirakata Y, Gotoh N, Fukushima K, Yanagihara K, Ohno H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Nishide K, Node M, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S.** 2006. Quorum sensing system lactones do not increase invasiveness of a MexAB-OprM efflux mutant but do play a partial role in *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *Microbiology and immunology* **50**:395-401.
156. **Koronakis V, Eswaran J, Hughes C.** 2004. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* **73**:467-489.
157. **Kumar A, Schweizer HP.** 2011. Evidence of MexT-independent overexpression of MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in presence of metabolic stress. *PloS one* **6**:e26520.
158. **Kümmerer K.** 2009a. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* **75**:417-434.
159. **Kümmerer K.** 2009b. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. *Chemosphere* **75**:435-441.
160. **Kurnasov O, Jablonski L, Polanuyer B, Dorrestein P, Begley T, Osterman A.** 2003. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS microbiology letters* **227**:219-227.
161. **Kuroda T, Tsuchiya T.** 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta* **1794**:763-768.
162. **Lacroix FJ, Cloeckaert A, Grepinet O, Pinault C, Popoff MY, Waxin H, Pardon P.** 1996. Salmonella typhimurium *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS microbiology letters* **135**:161-167.
163. **Lamarche MG, Deziel E.** 2011. MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas quinolone* signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PloS one* **6**:e24310.
164. **Lancaster CR.** 2002. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1553**:1-6.

165. **Lancaster CR, Simon J.** 2002. Succinate:quinone oxidoreductases from epsilon-proteobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1553**:84-101.
166. **Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A.** 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular microbiology* **21**:1137-1146.
167. **Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN.** 2004. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **2**:581-592.
168. **Leidal KG, Munson KL, Denning GM.** 2001. Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **25**:186-195.
169. **Lenski RE.** 1991. Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. *Biotechnology* **15**:173-192.
170. **Lertpiriyapong K, Gamazon ER, Feng Y, Park DS, Pang J, Botka G, Graffam ME, Ge Z, Fox JG.** 2012. *Campylobacter jejuni* Type VI Secretion System: Roles in Adaptation to Deoxycholic Acid, Host Cell Adherence, Invasion, and In Vivo Colonization. *PloS one* **7**:e42842.
171. **Lesic B, Starkey M, He J, Hazan R, Rahme LG.** 2009. Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* **155**:2845-2855.
172. **Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, Schrag S, Antia R, Simonsen L, Walker NM, Stewart FM.** 1997. The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**:S9-16.
173. **Levin BR, Perrot V, Walker N.** 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**:985-997.
174. **Levin BR, Stewart FM.** 1980. The population biology of bacterial plasmids: a priori conditions for the existence of mobilizable nonconjugative factors. *Genetics* **94**:425-443.
175. **Levin MA, Cabelli VJ.** 1972. Membrane filter technique for enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology* **24**:864-870.
176. **Lew W, Pai M, Oxlade O, Martin D, Menzies D.** 2008. Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine* **149**:123-134.
177. **Li XZ, Nikaido H.** 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**:159-204.
178. **Li XZ, Nikaido H.** 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* **69**:1555-1623.
179. **Li XZ, Nikaido H, Poole K.** 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1948-1953.
180. **Li XZ, Poole K, Nikaido H.** 2003a. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:27-33.
181. **Li XZ, Zhang L, Poole K.** 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J Bacteriol* **180**:2987-2991.
182. **Li Y, Mima T, Komori Y, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T.** 2003b. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **52**:572-575.
183. **Lin J, Cagliero C, Guo B, Barton YW, Maurel MC, Payot S, Zhang Q.** 2005. Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **187**:7417-7424.
184. **Lin J, Sahin O, Michel LO, Zhang Q.** 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infection and immunity* **71**:4250-4259.
185. **Linares JF.** 2005. Análisis genómico de la regulación cruzada entre la resistencia a los antibióticos y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

186. **Linares JF, Lopez JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martinez JL.** 2005. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**:1384-1391.
187. **Lindberg RH, Bjorklund K, Rendahl P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BA.** 2007. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water research* **41**:613-619.
188. **Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND.** 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews* **22**:582-610.
189. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
190. **Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ.** 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:105-116.
191. **Lubelski J, Konings WN, Driessen AJ.** 2007. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : **MMBR** **71**:463-476.
192. **Luthi E, Baur H, Gamper M, Brunner F, Villeval D, Mercenier A, Haas D.** 1990. The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. *Gene* **87**:37-43.
193. **Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst JE.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Molecular microbiology* **19**:101-112.
194. **Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **16**:45-55.
195. **Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**:47-56.
196. **Maisnier-Patin S, Berg OG, Liljas L, Andersson DI.** 2002. Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology* **46**:355-366.
197. **Marcusson LL, Frimodt-Moller N, Hughes D.** 2009. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS pathogens* **5**:e1000541.
198. **Martin RG, Bartlett ES, Rosner JL, Wall ME.** 2008. Activation of the *Escherichia coli* *marA/soxS/rob* regulon in response to transcriptional activator concentration. *Journal of molecular biology* **380**:278-284.
199. **Martinez JL.** 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* **321**:365-367.
200. **Martinez JL.** 2009a. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* **157**:2893-2902.
201. **Martinez JL.** 2009b. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut*.
202. **Martinez JL, Baquero F.** 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical microbiology reviews* **15**:647-679.
203. **Martinez JL, Sanchez MB, Martinez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, Alvarez-Ortega C.** 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **33**:430-449.
204. **Martins A, Spengler G, Rodrigues L, Viveiros M, Ramos J, Martins M, Couto I, Fanning S, Pages JM, Bolla JM, Molnar J, Amaral L.** 2009. pH Modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: protection during its passage and eventual colonization of the colon. *PloS one* **4**:e6656.



205. **Maseda H, Saito K, Nakajima A, Nakae T.** 2000. Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS microbiology letters **192**:107-112.
206. **Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N.** 2004. Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **48**:1320-1328.
207. **Maseda H, Uwate M, Nakae T.** 2010. Transcriptional regulation of the *mexEF-oprN* multidrug efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in *nfxC*-type mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS microbiology letters.
208. **Maseda H, Yoneyama H, Nakae T.** 2000. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **44**:658-664.
209. **Massova I, Mobashery S.** 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother **42**:1-17.
210. **Masuda N, Gotoh N, Ohya S, Nishino T.** 1996. Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **40**:909-913.
211. **Masuda N, Sakagawa E, Ohya S.** 1995. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **39**:645-649.
212. **Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** 2000a. Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **44**:2242-2246.
213. **Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** 2000b. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **44**:3322-3327.
214. **Matsuo Y, Eda S, Gotoh N, Yoshihara E, Nakae T.** 2004. MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA. FEMS microbiology letters **238**:23-28.
215. **Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M.** 1982. o-Type cytochrome oxidase in the membrane of aerobically grown *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS letters **139**:255-258.
216. **Matsushita K, Yamada M, Shinagawa E, Adachi O, Ameyama M.** 1983. Membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. A KCN-insensitive alternate oxidase chain and its energetics. Journal of biochemistry **93**:1137-1144.
217. **Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS.** 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol **183**:6454-6465.
218. **McArthur JV, Tuckfield RC.** 2000. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. Appl Environ Microbiol **66**:3722-3726.
219. **McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL.** 2002. Antibiotic use in plant agriculture. Annu Rev Phytopathol **40**:443-465.
220. **Mima T, Joshi S, Gomez-Escalada M, Schweizer HP.** 2007. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. J Bacteriol **189**:7600-7609.
221. **Mima T, Schweizer HP.** 2010. The BpeAB-OprB efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system. Antimicrob Agents Chemother **54**:3113-3120.
222. **Mima T, Sekiya H, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T.** 2005. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology and immunology **49**:999-1002.

223. **Minagawa S, Inami H, Kato T, Sawada S, Yasuki T, Miyairi S, Horikawa M, Okuda J, Gotoh N.** 2012. RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol* **12**:70.
224. **Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E.** 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and immunity* **71**:2404-2413.
225. **Morita Y, Gilmour C, Metcalf D, Poole K.** 2009. Translational control of the antibiotic inducibility of the PA5471 gene required for mexXY multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **191**:4966-4975.
226. **Morita Y, Sobel ML, Poole K.** 2006. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *J Bacteriol* **188**:1847-1855.
227. **Moser C, Van Gennip M, Bjarnsholt T, Jensen PO, Lee B, Hougen HP, Calum H, Ciofu O, Givskov M, Molin S, Hoiby N.** 2009. Novel experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection model mimicking long-term host-pathogen interactions in cystic fibrosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **117**:95-107.
228. **Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordonez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ.** 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**:1526-1530.
229. **Muller M.** 2002. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free radical biology & medicine* **33**:1527-1533.
230. **Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A.** 2006. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**:173-179.
231. **Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**:587-593.
232. **Navas A, Cobas G, Talavera M, Ayala JA, Lopez JA, Martinez JL.** 2007. Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:13728-13731.
233. **Navon-Venezia S, Leavitt A, Ben-Ami R, Aharoni Y, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y.** 2005. Evaluation of an accelerated protocol for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli from positive blood cultures. *Journal of clinical microbiology* **43**:439-441.
234. **Nealson KH, Platt T, Hastings JW.** 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**:313-322.
235. **Nikaido H.** 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:1831-1836.
236. **Nikaido H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
237. **Nikaido H.** 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr Opin Microbiol* **1**:516-523.
238. **Nikaido H.** 2011. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **77**:1-60.
239. **Nikaido H, Pages JM.** 2012. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **36**:340-363.
240. **Nikaido H, Takatsuka Y.** 2009. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta* **1794**:769-781.
241. **Nikaido H, Zgurskaya HI.** 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **3**:215-218.
242. **Nilsson AI, Zorzet A, Kanth A, Dahlstrom S, Berg OG, Andersson DI.** 2006. Reducing the fitness cost of antibiotic resistance by amplification of initiator tRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:6976-6981.

243. **Nordling M, Young S, Karlsson BG, Lundberg LG.** 1990. The structural gene for cytochrome c551 from *Pseudomonas aeruginosa*. The nucleotide sequence shows a location downstream of the nitrite reductase gene. *FEBS letters* **259**:230-232.
244. **Nordmann P, Poirel L.** 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* **56**:463-469.
245. **Nouwens AS, Beatson SA, Whitchurch CB, Walsh BJ, Schweizer HP, Mattick JS, Cordwell SJ.** 2003. Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the las and rhl quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **149**:1311-1322.
246. **Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE.** 1999. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1085-1090.
247. **Okazaki T, Hirai K.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *nfxB* gene, conferring resistance to new quinolones. *FEMS microbiology letters* **76**:197-202.
248. **Okusu H, Ma D, Nikaido H.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* **178**:306-308.
249. **Oliveros J.** 2007. FIESTA@BioinfoGP. An interactive server for analyzing DNA microarray experiments with replicates.
250. **Pages JM, James CE, Winterhalter M.** 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **6**:893-903.
251. **Palmer KL, Aye LM, Whiteley M.** 2007. Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *J Bacteriol* **189**:8079-8087.
252. **Palumbi SR.** 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* **293**:1786-1790.
253. **Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T.** 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Molecular microbiology* **68**:223-240.
254. **Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **62**:1-34.
255. **Papadopoulos CJ, Carson CF, Chang BJ, Riley TV.** 2008. Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1,8-cineole, and alpha-terpineol. *Appl Environ Microbiol* **74**:1932-1935.
256. **Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH.** 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**:1127-1130.
257. **Paulsen IT.** 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol* **6**:446-451.
258. **Paulsen IT, Chen J, Nelson KE, Saier MH, Jr.** 2001. Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **3**:145-150.
259. **Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH.** 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**:5756-5767.
260. **Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**:1203-1210.
261. **Perez A, Poza M, Aranda J, Latasa C, Medrano FJ, Tomas M, Romero A, Lasa I, Bou G.** 2012a. Effect of the transcriptional activators SoxS, RobA and RamA on expression of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*.
262. **Perez A, Poza M, Fernandez A, Fernandez Mdel C, Mallo S, Merino M, Rumbo-Feal S, Cabral MP, Bou G.** 2012b. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:2084-2090.
263. **Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH.** 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**:3127-3132.

264. **Petersen AD, Walker RD, Bowman MM, Schott HC, 2nd, Rosser EJ, Jr.** 2002. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *Journal of the American Animal Hospital Association* **38**:407-413.
265. **Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
266. **Pfister P, Corti N, Hobbie S, Bruell C, Zarivach R, Yonath A, Bottger EC.** 2005. 23S rRNA base pair 2057-2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A-->G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5180-5185.
267. **Piddock LJ.** 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature reviews. Microbiology* **4**:629-636.
268. **Poirel L, Liard A, Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P.** 2005a. Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* **56**:1118-1121.
269. **Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P.** 2005b. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3523-3525.
270. **Poole K.** 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **3**:255-264.
271. **Poole K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**:20-51.
272. **Poole K.** 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of medicine* **39**:162-176.
273. **Poole K, Krebes K, McNally C, Neshat S.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* **175**:7363-7372.
274. **Poole RK, Hughes MN.** 2000. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Molecular microbiology* **36**:775-783.
275. **Poonsuk K, Chuanchuen R.** 2012. Contribution of the MexXY Multidrug Efflux Pump and Other Chromosomal Mechanisms on Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Canine and Feline Infections. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*.
276. **Potvin E, Lehoux DE, Kukavica-Ibrulj I, Richard KL, Sanschagrin F, Lau GW, Levesque RC.** 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**:1294-1308.
277. **Ramsey MM, Whiteley M.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. *Molecular microbiology* **53**:1075-1087.
278. **Rau MH, Marvig RL, Ehrlich GD, Molin S, Jelsbak L.** 2012. Deletion and acquisition of genomic content during early stage adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to a human host environment. *Environ Microbiol* **14**:2200-2211.
279. **Ray A, Williams HD.** 1996. A mutant of *Pseudomonas aeruginosa* that lacks c-type cytochromes has a functional cyanide-insensitive oxidase. *FEMS microbiology letters* **135**:123-129.
280. **Records AR.** 2011. The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **24**:751-757.
281. **Rello J, Jubert P, Valles J, Artigas A, Rue M, Niederman MS.** 1996. Evaluation of outcome for intubated patients with pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **23**:973-978.
282. **Robertson GT, Doyle TB, Du Q, Duncan L, Mdluli KE, Lynch AS.** 2007. A Novel indole compound that inhibits *Pseudomonas aeruginosa* growth by targeting MreB is a substrate for MexAB-OprM. *J Bacteriol* **189**:6870-6881.
283. **Ruiz-Diez B, Sanchez P, Baquero F, Martinez JL, Navas A.** 2003. Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans*-*Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis model. *Journal of theoretical biology* **225**:469-476.
284. **Rust L, Messing CR, Iglewski BH.** 1994. Elastase assays. *Methods in enzymology* **235**:554-562.
285. **Saier MH, Jr., Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H.** 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J* **12**:265-274.



286. **Saito K, Yoneyama H, Nakae T.** 1999. *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. FEMS microbiology letters **179**:67-72.
287. **Sambrook P, Russell D.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, New York.
288. **Sanchez MB, Hernandez A, Rodriguez-Martinez JM, Martinez-Martinez L, Martinez JL.** 2008. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. BMC Microbiol **8**:148.
289. **Sanchez P, Linares JF, Ruiz-Diez B, Campanario E, Navas A, Baquero F, Martinez JL.** 2002a. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. J Antimicrob Chemother **50**:657-664.
290. **Sanchez P, Rojo F, Martinez JL.** 2002b. Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* multidrug efflux pump. FEMS microbiology letters **207**:63-68.
291. **Sander P, Springer B, Prammananan T, Sturmfels A, Kappler M, Pletschette M, Bottger EC.** 2002. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. Antimicrob Agents Chemother **46**:1204-1211.
292. **Schaible B, Taylor CT, Schaffer K.** 2012. Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. Antimicrob Agents Chemother **56**:2114-2118.
293. **Schrag SJ, Perrot V, Levin BR.** 1997. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society **264**:1287-1291.
294. **Schreiber K, Krieger R, Benkert B, Eschbach M, Arai H, Schobert M, Jahn D.** 2007. The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. J Bacteriol **189**:4310-4314.
295. **Schuetzer-Muehlbauer M, Willinger B, Egner R, Ecker G, Kuchler K.** 2003. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. International journal of antimicrobial agents **22**:291-300.
296. **Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP.** 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. J Bacteriol **185**:2066-2079.
297. **Schwarz S, Hood RD, Mougous JD.** 2010. What is type VI secretion doing in all those bugs? Trends in microbiology **18**:531-537.
298. **Schweizer HP.** 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res **2**:48-62.
299. **Sekiya H, Mima T, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T.** 2003. Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, *mexHI-opmD*, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. Antimicrob Agents Chemother **47**:2990-2992.
300. **Sharma V, Noriega CE, Rowe JJ.** 2006. Involvement of Nark1 and Nark2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Appl Environ Microbiol **72**:695-701.
301. **Shoesmith JH, Sherris JC.** 1960. Studies on the mechanism of arginine-activated motility in a *Pseudomonas* strain. Journal of general microbiology **22**:10-24.
302. **Silver S, Phung LT.** 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annu Rev Microbiol **50**:753-789.
303. **Silvestrini MC, Falcinelli S, Ciabatti I, Cutruzzola F, Brunori M.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): an overview. Biochimie **76**:641-654.
304. **Silvestrini MC, Galeotti CL, Gervais M, Schinina E, Barra D, Bossa F, Brunori M.** 1989. Nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: sequence of the gene and the protein. FEBS letters **254**:33-38.
305. **Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M.** 2003. Antibiotic resistance-the interplay between antibiotic use in animals and human beings. Lancet Infect Dis **3**:47-51

306. **Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silbergeld EK, Morris JG, Jr.** 2002. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6434-6439.
307. **Soballe B, Poole RK.** 1999. Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* **145 ( Pt 8)**:1817-1830.
308. **Sobel ML, Neshat S, Poole K.** 2005. Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**:1246-1253.
309. **SooHoo CK, Hollocher TC.** 1990. Loss of nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa* cultured under N<sub>2</sub>O as determined by rocket immunoelectrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **56**:3591-3592.
310. **SooHoo CK, Hollocher TC.** 1991. Purification and characterization of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa* strain P2. *The Journal of biological chemistry* **266**:2203-2209.
311. **Spiro S.** 1994. The FNR family of transcriptional regulators. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**:23-36.
312. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, Approved standard M7A4, vol. 4th edn., Wayne, PA, USA.
313. **Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M.** 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of general microbiology* **43**:159-271.
314. **Starr LM, Fruci M, Poole K.** 2012. Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa* *mexAB-oprM* efflux operon: involvement of repressors NalC and MexR and the antirepressor ArmR. *PloS one* **7**:e32684.
315. **Stickland HG, Davenport PW, Lilley KS, Griffin JL, Welch M.** 2010. Mutation of *nfxB* causes global changes in the physiology and metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Proteome Res* **9**:2957-2967.
316. **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, y cols.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-964.
317. **Swift S, Downie JA, Whitehead NA, Barnard AM, Salmond GP, Williams P.** 2001. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Advances in microbial physiology* **45**:199-270.
318. **Tan MW, Ausubel FM.** 2000. *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **3**:29-34.
319. **Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM.** 1999a. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:715-720.
320. **Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM.** 1999b. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2408-2413.
321. **Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, Prince A.** 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infection and immunity* **64**:37-43.
322. **Tegoni M, Silvestrini MC, Lamzin VS, Brunori M, Cambillau C.** 1994. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a new crystal form of nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology* **243**:347-350.
323. **Thaden JT, Lory S, Gardner TS.** 2010. Quorum-sensing regulation of a copper toxicity system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**:2557-2568.
324. **Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H.** 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:2512-2518.

325. **Tian ZX, Fargier E, Mac Aogain M, Adams C, Wang YP, O’Gara F.** 2009a. Transcriptome profiling defines a novel regulon modulated by the LysR-type transcriptional regulator MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* **37**:7546-7559.
326. **Tian ZX, Mac Aogain M, O’Connor HF, Fargier E, Mooij MJ, Adams C, Wang YP, O’Gara F.** 2009b. MexT modulates virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* independent of the MexEF-OprN efflux pump. *Microb Pathog* **47**:237-241.
327. **Toyofuku M, Nomura N, Fujii T, Takaya N, Maseda H, Sawada I, Nakajima T, Uchiyama H.** 2007. Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **189**:4969-4972.
328. **Trias J, Nikaido H.** 1990. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:52-57.
329. **Trias J, Nikaido H.** 1990. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *The Journal of biological chemistry* **265**:15680-15684.
330. **Trumpower BL.** 1990. Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiological reviews* **54**:101-129.
331. **Trumpower BL.** 1991. The three-subunit cytochrome bc1 complex of *Paracoccus denitrificans*. Its physiological function, structure, and mechanism of electron transfer and energy transduction. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **23**:241-255.
332. **Trunk K, Benkert B, Quack N, Munch R, Scheer M, Garbe J, Jansch L, Trost M, Wehland J, Buer J, Jahn M, Schobert M, Jahn D.** 2010. Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol* **12**:1719-1733.
333. **van der Oost J, de Boer AP, de Gier JW, Zumft WG, Stouthamer AH, van Spanning RJ.** 1994. The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *FEMS microbiology letters* **121**:1-9.
334. **Vander Wauven C, Pierard A, Kley-Raymann M, Haas D.** 1984. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* **160**:928-934.
335. **Vila J, Martinez JL.** 2008. Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Current drug targets* **9**:797-807.
336. **von Bodman SB, Willey JM, Diggle SP.** 2008. Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *J Bacteriol* **190**:4377-4391.
337. **Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH.** 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**:2080-2095.
338. **Walker TS, Bais HP, Deziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant physiology* **134**:320-331.
339. **Warner DM, Folster JP, Shafer WM, Jerse AE.** 2007. Regulation of the MtrC-MtrD-MtrE efflux-pump system modulates the in vivo fitness of *Neisseria gonorrhoeae*. *The Journal of infectious diseases* **196**:1804-1812.
340. **Warner DM, Shafer WM, Jerse AE.** 2008. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness. *Molecular microbiology* **70**:462-478.
341. **Webber MA, Piddock LJ.** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **51**:9-11.
342. **West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ.** 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**:81-86.
343. **Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP.** 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13904-13909.

344. **World Health Organization.** 2006. Overcoming antibiotic resistance. World Health Organization Report in Infection diseases.
345. **Wilson JF.** 2002. Renewing the fight against bacteria. *The Scientist* **16**:22-23.
346. **Williams HD, Zlosnik JE, Ryall B.** 2007a. Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Advances in microbial physiology* **52**:1-71.
347. **Williams P.** 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* **153**:3923-3938.
348. **Williams P, Camara M.** 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**:182-191.
349. **Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M.** 2007b. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **362**:1119-1134.
350. **Winson MK, Camara M, Latifi A, Foglino M, Chhabra SR, Daykin M, Bally M, Chapon V, Salmond GP, Bycroft BW, y cols.** 1995. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:9427-9431.
351. **Winstanley C, Fothergill JL.** 2009. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS microbiology letters* **290**:1-9.
352. **Withers H, Swift S, Williams P.** 2001. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**:186-193.
353. **Wolter DJ, Smith-Moland E, Goering RV, Hanson ND, Lister PD.** 2004. Multidrug resistance associated with *mexXY* expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **50**:43-50.
354. **Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, Jorgensen JH, Klugman KP.** 2005. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3554-3557.
355. **Woodford N, Livermore DM.** 2009. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *The Journal of infection* **59 Suppl 1**:S4-16.
356. **Wright GD.** 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* **13**:589-594.
357. **Wu CP, Hsieh CH, Wu YS.** 2011. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Molecular pharmaceutics* **8**:1996-2011.
358. **Ye RW, Haas D, Ka JO, Krishnapillai V, Zimmermann A, Baird C, Tiedje JM.** 1995. Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol* **177**:3606-3609.
359. **Yiruhan, Wang QJ, Mo CH, Li YW, Gao P, Tai YP, Zhang Y, Ruan ZL, Xu JW.** 2010. Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. *Environ Pollut* **158**:2350-2358.
360. **Yu J, Wu J, Francis KP, Purchio TF, Kadurugamuwa JL.** 2005. Monitoring in vivo fitness of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* mutants in a mouse biofilm infection model. *J Antimicrob Chemother* **55**:528-534.
361. **Zannoni D.** 1989. The respiratory chains of pathogenic pseudomonads. *Biochim Biophys Acta* **975**:299-316.
362. **Zgurskaya HI, Nikaido H.** 1999. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7190-7195.
363. **Zhang A, Rosner JL, Martin RG.** 2008. Transcriptional activation by MarA, SoxS and Rob of two tolC promoters using one binding site: a complex promoter configuration for tolC in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **69**:1450-1455.
364. **Zhao WH, Hu Z, Chen G, Ito R, Hu ZQ.** 2009. Contributions of IMP-10 metallo-beta-lactamase, the outer membrane barrier and the MexAB-OprM efflux system to high-level carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* **55**:168-174.

365. **Zimmermann A, Reimann C, Galimand M, Haas D.** 1991. Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **5**:1483-1490.
366. **Zorzet A, Pavlov MY, Nilsson AI, Ehrenberg M, Andersson DI.** 2010. Error-prone initiation factor 2 mutations reduce the fitness cost of antibiotic resistance. *Molecular microbiology* **75**:1299-1313.
367. **Zumft WG.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **61**:533-616.
368. **Zumft WG.** 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal of inorganic biochemistry* **99**:194-215.
369. **Zumft WG, Kroneck PM.** 2007. Respiratory transformation of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Advances in microbial physiology* **52**:107-227.



## ÍNDICE DE TABLAS

---





## Índice de tablas

Tabla 3.1. Cepas bacterianas y organismos utilizados en este trabajo.....	54
Tabla 3.2. Plásmidos y construcciones empleadas en este trabajo.....	55
Tabla 3.3. Lista de cebadores utilizados en este trabajo.....	58
Tabla 4.1. Determinación de la CMI mediante E-test® de los mutantes del sistema MexEF-OprN.....	69
Tabla 4.2: Tiempo de duplicación de las cepas del sistema MexEF-OprN crecidas en diferentes medios de cultivo.....	70
Tabla 4.3. Resumen de los genes que presentan una expresión diferencial en las cepas PT149 y PT637 en las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento. ....	74
Tabla 4.4. Resumen de los genes que presentan una expresión diferencial en las cepas PT149 y PT637 que pertenecen al regulón de <i>quorum sensing</i> .....	76
Tabla 4.5. Expresión diferencial de todas las bombas de la familia RND presentes <i>P. aeruginosa</i> en la cepa PT149.....	77
Tabla 4.6. Análisis de la producción de factores de virulencia regulados por <i>quorum sensing</i> .....	81
Tabla 4.7. Producción de factores de virulencia regulados por <i>quorum sensing</i> en presencia de antranilato.....	85
Tabla 4.8. Determinación del tiempo de duplicación utilizando los intermediarios de la síntesis de PQS como única fuente de carbono.....	85
Tabla 4.9. Determinación de la CMI para SNP y GSNO.....	92
Tabla 4.10. Determinación del tiempo de duplicación con concentraciones sub-inhedoras de SNP.....	92
Tabla 4.11. Estimación de la CMI y cálculo del tiempo de duplicación para SNP en mutantes que sobre-expresan bombas de la familia RND.....	93
Tabla 4.12. Estimación de la CMI y cálculo del tiempo de duplicación para SNP en el mutante de <i>E. coli</i> que sobre-expresa la bomba AcrAB-TolC.....	95
Tabla 4.13. Consumo de oxígeno de los diferentes mutantes que sobre-expresan bombas RND en <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> .....	97
Tabla 4.14. Determinación del tiempo de duplicación en fermentador.....	97
Tabla 4.15. Estimación de la CMI y cálculo del tiempo de duplicación para SNP en el mutante de delección de <i>nirS</i> .....	100
Tabla 4.16. Tiempo de duplicación en medio LB carente de nitrato.....	104



## ÍNDICE DE FIGURAS

---



## Índice de Figuras

Figura 1.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	31
Figura 1.2 Ensayos clásicos de determinación del coste de <i>fitness</i> .....	32
Figura 1.3. Esquema de la estructura del sistema MDR AcrAB-TolC de <i>E. coli</i> .....	33
Figura 1.4. Disposición en el genoma y regulación transcripcional de los sistemas múltiples de bombeo pertenecientes a la familia RND.....	36
Figura 1.5 Mecanismos de regulación del sistema de <i>quorum sensing</i> .....	39
Figura 1.6. Vía de síntesis del antranilato.....	40
Figura 1.7. Cadena respiratoria de nitrato.....	42
Figura 1.8. Esquema de la regulación de los mecanismos de obtención de energía de <i>P. aeruginosa</i> .....	44
Figura 4.1. Estimación del <i>fitness</i> relativo de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN mediante ensayos de competición.....	71
Figura 4.2. Análisis del transcriptoma de los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN.....	72
Figura 4.3: Análisis de la expresión de otras bombas RND de <i>P. aeruginosa</i> mediante de RT-PCR en tiempo real en la cepa PT149.....	77
Figura 4.4. Determinación de la expresión de los genes de la cadena respiratoria de nitrato mediante RT-PCR en tiempo real en las cepas PT149 y PT637.....	78
Figura 4.5. Verificación de la expresión de los genes <i>hcnA</i> y <i>pqsA</i> .....	78
Figura 4.6. Evaluación de la expresión de los genes del SST6.....	79
Figura 4.7. Evaluación de la expresión de genes involucrados en <i>quorum sensing</i> en fase estacionaria de crecimiento.....	80
Figura 4.8. Estimación de la expresión de genes marcadores del regulón de <i>quorum sensing</i> .....	80
Figura 4.9. Producción de pigmentos en los diferentes mutantes del sistema MexEF-OprN.....	81
Figura 4.10. Evaluación de la producción de PQS y HHQ.....	82
Figura 4.11. Efecto de la adición de antranilato en la producción de PQS y HHQ.....	83
Figura 4.12 Efecto de la adición de antranilato en las cepas PT149 y PT637.....	84
Figura 4.13. Efecto de la adición de antranilato en los genes marcadores del regulón de <i>quorum sensing</i> .....	84
Figura 4.14. Determinación del intermediario de la síntesis de PQS expulsado por MexEF-OprN.....	86
Figura 4.15 Efecto de la sobre-expresión de <i>kynB</i> en la producción de PQS y HHQ.....	87
Figura 4.16. Efecto de la sobre-expresión de <i>kynB</i> en la cepa PT149.....	87
Figura 4.17. Evaluación de la expresión de los genes del SST3 y del SST6.....	88
Figura 4.18. Efecto de la adición de antranilato sobre los niveles de expresión de los SST3 y SST6.....	89

Figura 4.19. Efecto de la sobre-expresión de MexEF-OprN sobre la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> en el modelo de <i>C. elegans</i> .....	90
Figura 4.20. Efecto de la adición de antranilato sobre la expresión de la cadena respiratoria de nitrato.....	91
Figura 4.21. Efecto de la sobre-expresión de MexEF-OprN en la activación de las oxidasas terminales CIO y CYO mediada por SNP y GSNO.....	93
Figura 4.22. Análisis de la expresión mediante RT-PCR en tiempo real de los genes de la cadena respiratoria de nitrato en mutantes que sobre-expresan bombas RND.....	94
Figura 4.23. Verificación del mutante de <i>E. coli</i> que sobre-expresa la bomba AcrAB-TolC.....	95
Figura 4.24. Análisis de la expresión de genes que participan en la asimilación de nitrito en <i>E. coli</i> .....	96
Figura 4.25. Análisis de la expresión de diferentes bombas RND en el mutante PT149.....	98
Figura 4.26. Análisis de la expresión de <i>cbb3</i> , <i>anr</i> y <i>dnr</i> en la cepa PT149.....	98
Figura 4.27. Análisis de la expresión de la cadena respiratoria de nitrato en la cepa PT149.	99
Figura 4.28. Verificación de la inactivación de la cadena respiratoria de nitrato.....	100
Figura 4.29. Activación de la vía de la arginina deiminasa.....	101
Figura 4.30. Producción de óxido nítrico.....	102
Figura 4.31. Consumo de nitrato desde el medio LB.....	103
Figura 4.32. Estimación del <i>fitness</i> relativo de la cepa PT149 en medio LB carente de nitrato.....	104

## **ANEXO 1**

---





		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA0007	Hypothetical protein	NC	-2.1	NC	-2.5
PA0059	<i>osmC</i> , osmotically inducible protein OsmC	NC	-3.0	NC	NC
PA0084	Conserved hypothetical protein	-2.2	NC	-2.7	NC
PA0085	Conserved hypothetical protein	-3.4	NC	-3.6	NC
PA0090	Probable ClpA/B-type chaperone	-2.7	NC	-3.0	NC
PA0100	Hypothetical protein	NC	NC	-2.5	NC
PA0122	Conserved hypothetical protein	NC	-3.8	NC	-1.6
PA0263	<i>hcpC</i> , secreted protein Hcp	-4.0	-9.5	NC	NC
PA0283	<i>sbp</i> , sulfate-binding protein precursor	NC	2.5	NC	NC
PA0295	Probable periplasmic polyamine binding protein	NC	NC	2.5	1.7
PA0446	Conserved hypothetical protein	NC	2.7	NC	NC
PA0456	Probable cold-shock protein	NC	NC	7.2	NC
PA0509	<i>nirN</i> , probable c-type cytochrome	NC	NC	NC	4.3
PA0510	Probable uroporphyrin-III c-methyltransferase	NC	NC	NC	4.5
PA0511	<i>nirJ</i> , heme d1 biosynthesis protein NirJ	NC	NC	NC	4.7
PA0512	Conserved hypothetical protein	NC	NC	NC	5.4
PA0513	Probable transcriptional regulator	NC	NC	NC	6.2
PA0523	<i>norC</i> , nitric-oxide reductase subunit C	5.1	-27	NC	NC
PA0526	Hypothetical protein	NC	-6.5	NC	NC
PA0527	<i>dnr</i> , transcriptional regulator Dnr	NC	NC	5.0	NC
PA0534	Conserved hypothetical protein	NC	-3.5	NC	NC
PA0567	Conserved hypothetical protein	NC	-2.6	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA0579	<i>rpsU</i>   30S ribosomal protein S21	NC	NC	4.5	NC
PA0616	Hypothetical protein	NC	NC	-3.8	NC
PA0617	Probable bacteriophage protein	NC	NC	-3.0	NC
PA0619	Probable bacteriophage protein	NC	NC	-3.1	NC
PA0620	Probable bacteriophage protein	NC	NC	-2.8	NC
PA0621	Probable bacteriophage protein	NC	NC	-2.7	NC
PA0622	Probable bacteriophage protein	NC	NC	-2.9	NC
PA0623	Probable bacteriophage protein	NC	NC	-2.9	NC
PA0624	Hypothetical protein	NC	NC	-2.9	NC
PA0627	Conserved hypothetical protein	NC	NC	-2.7	NC
PA0628	Conserved hypothetical protein	NC	NC	-2.7	NC
PA0629	Conserved hypothetical protein	NC	NC	-2.9	NC
PA0631	Hypothetical protein	NC	NC	-3.2	NC
PA0635	Hypothetical protein	NC	NC	-3.2	NC
PA0636	Hypothetical protein	NC	NC	-2.5	NC
PA0638	Probable bacteriophage protein	NC	NC	-2.7	NC
PA0646	hypothetical protein	NC	NC	-2.5	NC
PA0744	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	NC	NC	-2.5	NC
PA0745	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	NC	NC	-2.8	NC
PA0918	Cytochrome b561	NC	-1.9	-3.5	NC
PA0958	<i>oprD</i> , basic amino acid, basic peptide and imipenem outer membrane porin OprD precursor	-3.9	NC	-6.6	NC
PA0996	<i>pqsA</i> , probable coenzyme A ligase	-4.8	NC	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA0998	<i>pqsC</i> , Homologous to beta-keto-acyl-acyl-carrier protein synthase	NC	NC	-2.5	NC
PA0999	<i>pqsD</i> , 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	NC	NC	-2.6	NC
PA1000	<i>pqsE</i> , <i>q</i> quinolone signal response protein	-6.9	NC	-2.3	-1.6
PA1001	<i>phnA</i> , anthranilate synthase component I	-13	-1.6	-3.0	-2.8
PA1002	<i>phnB</i> , anthranilate synthase component II	-6.7	-1.7	-3.1	-2.6
PA1150	<i>pys2</i> , pyocin S2	NC	NC	-2.6	NC
PA1159	Probable cold-shock protein	NC	NC	6.1	NC
PA1196	Probable transcriptional regulator	NC	NC	3.5	NC
PA1213	Hypothetical protein	NC	-3.3	NC	NC
PA1214	Hypothetical protein	NC	-3.2	NC	NC
PA1215	Hypothetical protein	NC	-3.7	NC	NC
PA1216	Hypothetical protein	NC	-4.4	NC	NC
PA1217	Probable 2-isopropylmalate synthase	NC	-4.6	NC	NC
PA1218	Hypothetical protein	NC	-4.3	NC	NC
PA1323	Hypothetical protein	NC	-3.0	NC	NC
PA1324	Hypothetical protein	NC	-2.9	NC	-2.0
PA1333	Hypothetical protein	2.2	3.3	1.8	3.3
PA1404	Hypothetical protein	NC	NC	NC	-2.7
PA1421	<i>gbuA</i> , guanidinobutyrase	NC	NC	3.5	NC
PA1581	<i>sdhC</i> , succinate dehydrogenase (C subunit)	NC	NC	3.6	NC
PA1657	Conserved hypothetical protein	-4.4	-3.2	-4.1	NC
PA1658	Conserved hypothetical protein	-5.4	-3.7	-4.9	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA1659	Hypothetical protein	NC	-3.2	-3.9	NC
PA1660	Hypothetical protein	NC	-2.9	NC	NC
PA1662	Probable ClpA/B-type protease	NC	-2.5	NC	NC
PA1664	Hypothetical protein	NC	-4.1	NC	NC
PA1665	Hypothetical protein	NC	-2.5	NC	NC
PA1666	Hypothetical protein	NC	-2.6	NC	NC
PA1667	Hypothetical protein	NC	-3.1	-2.5	NC
PA1743	Hypothetical protein	NC	2.9	NC	3.5
PA1744	Hypothetical protein	NC	8.8	NC	9.3
PA1789	Hypothetical protein	-2.8	NC	NC	NC
PA1806	<i>fabI</i> , NADH-dependent enoyl-ACP reductase	NC	NC	-2.8	NC
PA1874	Hypothetical protein	NC	-3.1	NC	-3.0
PA1875	Probable outer membrane protein precursor	NC	-4.0	NC	-3.5
PA1876	Probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter	NC	-3.5	NC	-3.9
PA1877	Probable secretion protein	NC	-3.1	NC	-3.6
PA1894	Hypothetical protein	NC	-4.0	-2.4	-2.8
PA1895	Hypothetical protein	-2.3	-3.7	-2.7	-2.7
PA1896	Hypothetical protein	NC	-3.1	NC	-2.5
PA1897	Hypothetical protein	-2.5	-3.1	-2.9	NC
PA1901	<i>phzC2</i> , phenazine biosynthesis protein PhzC	-31	-8.9	NC	NC
PA1902	<i>phzD2</i> , phenazine biosynthesis protein PhzD	NC	-8.7	NC	NC
PA1903	<i>phzE2</i> , phenazine biosynthesis protein PhzE	NC	-11	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA1904	<i>phzF2</i> , probable phenazine biosynthesis protein	NC	-11	NC	NC
PA1905	<i>phzG2</i> , probable pyridoxamine 5-phosphate oxidase	NC	-12	NC	NC
PA1914	Conserved hypothetical protein	NC	-224	NC	-220
PA1915	Hypothetical protein	NC	-2.9	NC	-3.2
PA1930	Probable chemotaxis transducer	NC	-63	NC	-76
PA1931	Probable ferredoxin	NC	-3.4	NC	-4.3
PA1933	Probable hydroxylase large subunit	NC	-4.0	NC	-4.0
PA1939	Hypothetical protein	-2.1	-13	-2.3	-13
PA1941	Hypothetical protein	-2.2	-3.1	-2.4	-4.0
PA1943	Hypothetical protein	NC	-4.7	NC	-4.6
PA1944	Hypothetical protein	NC	-13	NC	-14
PA1946	<i>rbsB</i> , binding protein component precursor of ABC ribose transporter	NC	-32	-4.4	-38
PA1947	<i>rbsA</i> , ribose transport protein RbsA	NC	-8.0	NC	-9.2
PA1948	<i>rbsC</i> , membrane protein component of ABC ribose transporter	NC	-3.7	NC	-4.6
PA1949	<i>rbsR</i> , ribose operon repressor RbsR	NC	-9.5	NC	-11
PA1950	<i>rbsK</i> , ribokinase	NC	-19	-2.8	-25
PA1951	Hypothetical protein	NC	-5.2	NC	-5.0
PA1970	Hypothetical protein	NC	45	NC	56
PA2000	Probable CoA transferase, subunit B	NC	NC	-3.0	NC
PA2012	<i>gnyA</i> , alpha subunit of geranyl-CoA carboxylase, GnyA	NC	NC	-2.7	NC
PA2066	Hypothetical protein	NC	-4.3	NC	NC
PA2067	Probable hydrolase	NC	-6.9	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA2068	Probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	NC	-6.3	NC	NC
PA2069	Probable carbamoyl transferase	-2.2	-5.7	NC	NC
PA2128	<i>cupA1</i> , fimbrial subunit CupA1	NC	4.3	NC	NC
PA2142	Probable short-chain dehydrogenase	NC	-2.6	NC	-2.6
PA2149	Hypothetical protein	NC	-3.7	NC	NC
PA2151	Conserved hypothetical protein	NC	-2.9	NC	NC
PA2152	Probable trehalose synthase	NC	-4.1	NC	NC
PA2153	<i>glgB</i> , 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme	NC	-3.1	NC	NC
PA2159	Conserved hypothetical protein	NC	-3.9	NC	-3.7
PA2160	Probable glycosyl hydrolase	NC	-3.2	NC	NC
PA2163	Hypothetical protein	NC	-2.5	NC	NC
PA2164	Probable glycosyl hydrolase	NC	-4.5	NC	-4.5
PA2167	Hypothetical protein	NC	-3.1	NC	-2.3
PA2170	Hypothetical protein	NC	-4.8	NC	NC
PA2171	Hypothetical protein	NC	NC	NC	-4.4
PA2173	Hypothetical protein	NC	-4.4	NC	-4.4
PA2175	Hypothetical protein	NC	-2.5	NC	NC
PA2176	Hypothetical protein	NC	-2.9	NC	NC
PA2193	<i>hcnA</i> , hydrogen cyanide synthase HcnA	-9.3	NC	NC	NC
PA2194	<i>hcnB</i> , hydrogen cyanide synthase HcnB	-6.9	NC	NC	NC
PA2195	<i>hcnC</i> , hydrogen cyanide synthase HcnC	-7.1	NC	NC	NC
PA2204	Probable binding protein component of ABC transporter	-5.1	NC	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA2248	<i>bkdA2</i> , 2-oxoisovalerate dehydrogenase (beta subunit)	NC	NC	-2.8	NC
PA2250	<i>lpdV</i> , lipoamide dehydrogenase-Val	NC	NC	-2.5	NC
PA2274	Hypothetical protein	NC	-16	NC	NC
PA2300	<i>chiC</i> , chitinase	NC	-13	NC	NC
PA2317	Probable oxidoreductase	NC	3.2	NC	NC
PA2414	<i>L</i> -sorbosone dehydrogenase	NC	-2.7	NC	-1.7
PA2415	Hypothetical protein	NC	-2.7	NC	NC
PA2433	Hypothetical protein	NC	-2.8	NC	-1.9
PA2486	Hypothetical protein	25	12	16.1	12
PA2491	<i>mexS</i> , probable oxidoreductase	9.6	18	9.3	18
PA2493	<i>mexE</i> , resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux membrane fusion protein MexE precursor	56	56	6.3	24
PA2494	<i>mexF</i> , Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux transporter MexF	94	69	NC	NC
PA2495	<i>oprN</i> , Multidrug efflux outer membrane protein OprN precursor	20	31	NC	NC
PA2552	Probable acyl-CoA dehydrogenase	NC	NC	-3.5	NC
PA2553	Probable acyl-CoA thiolase	NC	NC	-4.1	NC
PA2570	<i>pa1L</i> , PA-I galactophilic lectin	NC	-17	NC	-4.5
PA2624	<i>idh</i> , isocitrate dehydrogenase	NC	2.5	NC	NC
PA2662	Conserved hypothetical protein	4.9	NC	NC	NC
PA2663	Hypothetical protein	5.3	NC	-4.2	NC
PA2664	<i>fhp</i> , flavohemoprotein	4.3	-7.3	NC	NC
PA2759	Hypothetical protein	NC	25	NC	23
PA2811	Probable permease of ABC-2 transporter	NC	4.0	NC	3.9

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA2812	Probable ATP-binding component of ABC transporter	3.0	3.5	3.4	3.9
PA2813	Probable glutathione S-transferase	3.9	6.9	4.6	6.9
PA3001	Probable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NC	NC	2.9	NC
PA3032	<i>snr1</i> , cytochrome c Snr1	NC	-5.0	NC	-2.6
PA3038	Probable porin	NC	3.3	NC	NC
PA3192	<i>glrR</i> , two-component response regulator GlrR	NC	NC	NC	-2.5
PA3229	Hypothetical protein	54	129	60	180
PA3326	Probable Clp-family ATP-dependent protease	-10	NC	NC	NC
PA3327	Probable non-ribosomal peptide synthetase	-5.0	NC	NC	NC
PA3329	Hypothetical protein	-13	NC	NC	NC
PA3330	Probable short chain dehydrogenase	-14	NC	NC	NC
PA3331	Cytochrome P450	-27	NC	NC	NC
PA3332	Conserved hypothetical protein	-16	NC	NC	NC
PA3333	<i>fabH2</i> , 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	-9.0	NC	NC	NC
PA3334	Probable acyl carrier protein	-11	NC	NC	NC
PA3361	<i>lecB</i> , fucose-binding lectin PA-III	NC	NC	NC	-3.1
PA3369	Hypothetical protein	NC	-2.5	NC	NC
PA3371	Hypothetical protein	NC	-2.7	NC	NC
PA3392	<i>nosZ</i> , nitrous-oxide reductase precursor	11	NC	NC	NC
PA3393	<i>nosD</i> , NosD protein	NC	NC	NC	4.4
PA3394	<i>nosF</i> , NosF protein	NC	NC	NC	5.9
PA3395	<i>nosY</i> , NosY protein	NC	NC	NC	3.9



		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA3396	<i>nosL</i> , NosL protein	NC	NC	NC	3.2
PA3418	<i>ldh</i> , leucine dehydrogenase	NC	NC	-8.5	NC
PA3460	Probable acetyltransferase	NC	-3.0	NC	-2.6
PA3575	Hypothetical protein	NC	3.4	NC	NC
PA3602	Conserved hypothetical protein	NC	2.9	1.9	4.0
PA3662	Hypothetical protein	NC	2.8	NC	2.5
PA3665	Hypothetical protein	NC	NC	2.8	NC
PA3692	Probable outer membrane protein precursor	NC	-2.5	NC	NC
PA3720	Hypothetical protein	NC	NC	NC	-2.7
PA3721	Probable transcriptional regulator	NC	-3.7	NC	-4.2
PA3790	<i>oprC</i> , Putative copper transport outer membrane porin OprC precursor	NC	1.7	-4.1	NC
PA3815	Conserved hypothetical protein	4.1	NC	NC	NC
PA3822	Conserved hypothetical protein	NC	1.7	3.0	NC
PA3877	<i>narK1</i> , nitrite extrusion protein 1	NC	-11	-3.4	NC
PA3880	Conserved hypothetical protein	NC	NC	3.4	NC
PA3890	Probable permease of ABC transporter	NC	-2.5	NC	NC
PA3915	<i>moaB1</i> , molybdopterin biosynthetic protein B1	NC	-22	NC	NC
PA3919	Conserved hypothetical protein	NC	NC	-3.8	NC
PA4042	<i>xseB</i> , exodeoxyribonuclease VII small subunit	NC	1.5	2.5	NC
PA4073	Probable aldehyde dehydrogenase	NC	3.3	NC	NC
PA4091	<i>hpaA</i> , 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase large chain	NC	9.8	NC	NC
PA4092	<i>hpaC</i> , 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase small chain	NC	8.2	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA4100	Probable dehydrogenase	NC	3.1	NC	NC
PA4121	Conserved hypothetical protein	NC	4.9	NC	NC
PA4122	Conserved hypothetical protein	NC	3.5	NC	NC
PA4123	<i>hpcC</i> , 5-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase	NC	6.2	NC	NC
PA4124	<i>hpcB</i> , homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase	NC	5.2	NC	NC
PA4125	<i>hpcD</i> , 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase	NC	5.6	NC	1.6
PA4132	Conserved hypothetical protein	NC	NC	-3.1	NC
PA4134	Hypothetical protein	NC	NC	-4.0	NC
PA4141	Hypothetical protein	NC	-4.6	NC	NC
PA4175	<i>prpL</i> , PvdS-regulated endoprotease, lysyl class	NC	-3.8	-2.7	NC
PA4205	<i>mexG</i> , hypothetical protein	NC	-87	NC	-8.9
PA4206	<i>mexH</i> , probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein precursor	NC	-42	NC	-6.5
PA4207	<i>mexI</i> , probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux transporter	NC	-23	NC	-7.4
PA4208	<i>opmD</i> , probable outer membrane protein precursor	NC	-13	NC	-6.0
PA4211	<i>phzB2</i> , probable phenazine biosynthesis protein	-60	-13	NC	NC
PA4235	<i>bfrA</i> , bacterioferritin	NC	NC	NC	2.6
PA4293	Probable two-component sensor	NC	-4.5	NC	-4.2
PA4294	Hypothetical protein	NC	-4.2	NC	-3.8
PA4298	Hypothetical protein	NC	-2.5	NC	NC
PA4351	Probable acyltransferase	-2.5	NC	NC	NC
PA4353	Conserved hypothetical protein	NC	2.9	NC	2.1
PA4354	Conserved hypothetical protein	NC	15	6.4	13

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA4356	<i>xenB</i> , xenobiotic reductase	7.8	11	6.4	11
PA4431	Probable iron-sulfur protein	NC	1.7	2.6	NC
PA4482	<i>gatC</i> , Glu-tRNA(Gln) amidotransferase subunit C	NC	2.2	3.8	NC
PA4563	<i>rpsT</i> , 30S ribosomal protein S20	NC	NC	6.5	NC
PA4623	Hypothetical protein	8.1	15	NC	21
PA4648	Hypothetical protein	NC	-2.8	NC	-2.7
PA4649	Hypothetical protein	NC	-2.9	NC	NC
PA4650	Hypothetical protein	NC	-3.4	NC	NC
PA4651	Probable pili assembly chaperone	NC	-4.9	NC	-4.0
PA4652	Hypothetical protein	NC	-3.3	NC	NC
PA4653	Hypothetical protein	NC	-3.2	NC	-3.1
PA4661	<i>pagL</i> , Lipid A 3-O-deacylase	2.4	NC	2.7	NC
PA4738	Conserved hypothetical protein	NC	-2.8	NC	NC
PA4739	Conserved hypothetical protein	NC	-2.9	NC	NC
PA4846	<i>aroQ1</i> , 3-dehydroquinate dehydratase	NC	NC	3.4	NC
PA4876	<i>osmE</i> , osmotically inducible lipoprotein OsmE	NC	-2.6	NC	NC
PA4881	Hypothetical protein	82.4	187	43	152
PA4918	Hypothetical protein	NC	4.2	NC	NC
PA4919	<i>pncB1</i> , nicotinate phosphoribosyltransferase	NC	4.8	NC	NC
PA4920	<i>nadE</i> , NH <sub>3</sub> -dependent NAD synthetase	NC	2.7	NC	NC
PA4973	<i>thiC</i> , thiamin biosynthesis protein ThiC	1.9	6.8	NC	8.0
PA5058	<i>phaC2</i> , poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2	NC	-2.6	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		149 vs. Wt		637 vs. Wt	
Gene no. <sup>b</sup>	Description	Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
PA5068	<i>tatA</i> , translocation protein TatA	NC	NC	2.6	NC
PA5142	<i>hisH1</i> , glutamine amidotransferase	NC	NC	2.7	NC
PA5220	Hypothetical protein	-5.4	-3.1	-3.6	NC
PA5276	<i>lppL</i> , Lipopeptide LppL precursor	NC	NC	4.8	NC
PA5315	<i>rpmG</i> , 50S ribosomal protein L33	NC	NC	3.0	NC
PA5337	<i>rpoZ</i> , RNA polymerase omega subunit	NC	NC	3.1	NC
PA5482	Hypothetical protein	NC	-2.8	NC	NC
PA5531	<i>tonB</i> , TonB protein	3.2	NC	NC	NC
PA5569	<i>rnpA</i> , ribonuclease P protein component	NC	NC	4.3	NC
PA5570	<i>rpmH</i> , 50S ribosomal protein L34	NC	NC	5.7	NC

**Tabla 1: Análisis transcriptómico de las cepas PT149 y PT637 en fases logarítmica y estacionara de crecimiento.** El criterio de selección utilizado para establecer una variación de expresión aceptable fueron aquellos genes que presentaron un valor de expresión de 2,5 (positivo o negativo) y con un  $p < 0,05$  (FDR Limma) respecto a la cepa silvestre.

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		Fase estacionaria		Fase logarítmica	
Gene no. <sup>c</sup>	Description	149 vs Wt	637 vs Wt	149 vs Wt	637 vs Wt
PA0059	<i>osmC</i> . osmotically inducible protein OsmC <sup>d</sup>	-3.0	NC	NC	NC
PA0122	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.8	-1.6	NC	NC
PA0263	<i>hcpC</i> . secreted protein Hcp <sup>d</sup>	-9.5	NC	-4.0	NC
PA0534	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.5	NC	NC	NC
PA0567	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.6	NC	NC	NC
PA0996	<i>pqsA</i> . probable coenzyme A ligase <sup>d</sup>	NC	NC	-4.8	NC
PA1000	<i>pqsE</i> . <i>q</i> uinolone signal response protein <sup>d</sup>	NC	-1.6	-6.9	-2.3
PA1001	<i>phnA</i> . anthranilate synthase component I <sup>d</sup>	-1.6	-2.8	-13	-3.0
PA1002	<i>phnB</i> . anthranilate synthase component II <sup>d</sup>	-1.7	-2.6	-6.7	-3.1
PA1214	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.2	NC	NC	NC
PA1215	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.7	NC	NC	NC
PA1216	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.4	NC	NC	NC
PA1217	Probable 2-isopropylmalate synthase <sup>d</sup>	-4.6	NC	NC	NC
PA1218	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.3	NC	NC	NC
PA1323	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.0	NC	NC	NC
PA1324	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.9	-2.0	NC	NC
PA1657	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.2	NC	-4.4	-4.1
PA1658	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.7	NC	-5.4	-4.9
PA1659	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.2	NC	NC	-3.9
PA1660	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.9	NC	NC	NC
PA1662	Probable ClpA/B-type protease <sup>d</sup>	-2.5	NC	NC	NC
PA1664	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.1	NC	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		Fase estacionaria		Fase logarítmica	
Gene no. <sup>c</sup>	Description	149 vs Wt	637 vs Wt	149 vs Wt	637 vs Wt
PA1665	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.5	NC	NC	NC
PA1666	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.6	NC	NC	NC
PA1667	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.1	NC	NC	-2.5
PA1874	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.1	-3.0	NC	NC
PA1875	Probable outer membrane protein precursor <sup>d</sup>	-4.0	-3.5	NC	NC
PA1894	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.0	-2.8	NC	-2.4
PA1895	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.7	-2.7	-2.3	-2.7
PA1896	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.1	-2.5	NC	NC
PA1897	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.1	NC	-2.5	-2.9
PA1901	<i>phzC2</i> . phenazine biosynthesis protein PhzC <sup>d</sup>	-8.9	NC	-31	NC
PA1902	<i>phzD2</i> . phenazine biosynthesis protein PhzD <sup>d</sup>	-8.7	NC	NC	NC
PA1903	<i>phzE2</i> . phenazine biosynthesis protein	-11	NC	NC	NC
PA1904	<i>phzF2</i> . probable phenazine biosynthesis protein <sup>d</sup>	-11	NC	NC	NC
PA1905	<i>phzG2</i> . probable pyridoxamine 5-phosphate oxidase <sup>d</sup>	-12	NC	NC	NC
PA1914	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-224	-220	NC	NC
PA1930	Probable chemotaxis transducer <sup>d</sup>	-63	-76	NC	NC
PA1939	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-13	-13	-2.1	-2.3
PA2066	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.3	NC	NC	NC
PA2067	Probable hydrolase <sup>d</sup>	-6.9	NC	NC	NC
PA2068	Probable major facilitator superfamily (MFS) transporter <sup>d</sup>	-6.3	NC	NC	NC
PA2069	Probable carbamoyl transferase <sup>d</sup>	-5.7	NC	-2.2	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		Fase estacionaria		Fase logarítmica	
Gene no. <sup>c</sup>	Description	149 vs Wt	637 vs Wt	149 vs Wt	637 vs Wt
PA2142	Probable short-chain dehydrogenase <sup>d</sup>	-2.6	-2.6	NC	NC
PA2151	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.9	NC	NC	NC
PA2152	Probable trehalose synthase <sup>d</sup>	-4.1	NC	NC	NC
PA2153	<i>glgB</i> . 1.4-alpha-glucan branching enzyme <sup>d</sup>	-3.1	NC	NC	NC
PA2159	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.9	-3.7	NC	NC
PA2160	Probable glycosyl hydrolase <sup>d</sup>	-3.2	NC	NC	NC
PA2164	Probable glycosyl hydrolase <sup>d</sup>	-4.5	-4.5	NC	NC
PA2167	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.1	-2.3	NC	NC
PA2170	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.8	NC	NC	NC
PA2173	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.4	-4.4	NC	NC
PA2176	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.9	NC	NC	NC
PA2193	<i>hcnA</i> . hydrogen cyanide synthase HcnA <sup>d</sup>	NC	NC	-9.3	NC
PA2194	<i>hcnB</i> . hydrogen cyanide synthase HcnB <sup>d</sup>	NC	NC	-6.9	NC
PA2195	<i>hcnC</i> . hydrogen cyanide synthase HcnC <sup>d</sup>	NC	NC	-7.1	NC
PA2274	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-16	NC	NC	NC
PA2300	<i>chiC</i> . chitinase <sup>d</sup>	-13	NC	NC	NC
PA2414	<i>L</i> -sorbose dehydrogenase <sup>d</sup>	-2.7	-1.7	NC	NC
PA2415	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.7	NC	NC	NC
PA2433	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.8	-1.9	NC	NC
PA2570	<i>pa1L</i> . PA-I galactophilic lectin <sup>d</sup>	-17	-4.5	NC	NC
PA3032	<i>snr1</i> . cytochrome c Snr1 <sup>d</sup>	-5.0	-2.6	NC	NC
PA3038	Probable porin <sup>e</sup>	3.3	NC	NC	NC

		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		Fase estacionaria		Fase logarítmica	
Gene no. <sup>c</sup>	Description	149 vs Wt	637 vs Wt	149 vs Wt	637 vs Wt
PA3326	Probable Clp-family AT P-dependent protease <sup>d</sup>	NC	NC	-10	NC
PA3327	Probable non-ribosomal peptide synthetase <sup>d</sup>	NC	NC	-5.0	NC
PA3329	Hypothetical protein <sup>d</sup>	NC	NC	-13	NC
PA3330	Probable short chain dehydrogenase <sup>d</sup>	NC	NC	-14	NC
PA3331	Cytochrome P450 <sup>d</sup>	NC	NC	-27	NC
PA3332	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	NC	NC	-16	NC
PA3333	<i>fabH2</i> . 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III <sup>d</sup>	NC	NC	-9.0	NC
PA3334	Probable acyl carrier protein <sup>d</sup>	NC	NC	-11	NC
PA3369	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.5	NC	NC	NC
PA3371	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.7	NC	NC	NC
PA3392	<i>nosZ</i> . nitrous-oxide reductase precursor <sup>e</sup>	NC	NC	11	NC
PA3575	Hypothetical protein <sup>e</sup>	3.4	NC	NC	NC
PA3662	Hypothetical protein <sup>e</sup>	2.8	2.5	NC	NC
PA3721	Probable transcriptional regulator <sup>d</sup>	-3.7	-4.2	NC	NC
PA3877	<i>nark1</i> . nitrite extrusion protein 1 <sup>e</sup>	-11	NC	NC	-3.4
PA3915	<i>moaB1</i> . molybdopterin biosynthetic protein B1 <sup>d,f</sup>	-22	NC	NC	NC
PA4141	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.6	NC	NC	NC
PA4175	<i>prpL</i> . PvdS-regulated endoprotease. lysyl class <sup>d</sup>	-3.8	NC	NC	-2.7
PA4205	<i>mexG</i> . hypothetical protein <sup>d</sup>	-87	-8.9	NC	NC
PA4206	<i>mexH</i> . probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux membrane fusion protein	-42	-6.5	NC	NC
PA4207	<i>mexI</i> . probable Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) efflux transporter <sup>d</sup>	-25	-7.4	NC	NC
PA4208	<i>opmD</i> . probable outer membrane protein precursor <sup>d</sup>	-13	-6.0	NC	NC



		Expresión relativa a la cepa silvestre			
		Fase estacionaria		Fase logarítmica	
Gene no. <sup>c</sup>	Description	149 vs Wt	637 vs Wt	149 vs Wt	637 vs Wt
PA4211	<i>phzB2</i> . probable phenazine biosynthesis protein <sup>d</sup>	-13	NC	-60	NC
PA4293	Probable two-component sensor <sup>d</sup>	-4.5	-4.2	NC	NC
PA4294	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-4.2	-3.8	NC	NC
PA4648	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.8	-2.7	NC	NC
PA4649	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.9	NC	NC	NC
PA4650	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.4	NC	NC	NC
PA4651	Probable pili assembly chaperone <sup>d</sup>	-4.9	-4.0	NC	NC
PA4652	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.3	NC	NC	NC
PA4738	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.8	NC	NC	NC
PA4739	Conserved hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.9	NC	NC	NC
PA4876	<i>osmE</i> . osmotically inducible lipoprotein OsmE <sup>d</sup>	-2.6	NC	NC	NC
PA4918	Hypothetical protein <sup>e</sup>	4.2	NC	NC	NC
PA5058	<i>phaC2</i> . poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2 <sup>d</sup>	-2.6	NC	NC	NC
PA5220	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-3.1	NC	-5.4	-3.6
PA5482	Hypothetical protein <sup>d</sup>	-2.8	NC	NC	NC

**Tabla 2:** Comparación del transcriptoma de las cepas PT49 y PT637 en fases logarítmica y estacionaria con el regulón de *quorum sensing*



## **ANEXO 2**

---

### **Artículos Publicados**



# Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks

Jorge Olivares,<sup>1†</sup> Carolina Alvarez-Ortega,<sup>1†</sup>  
Juan F. Linares,<sup>1†</sup> Fernando Rojo,<sup>1</sup> Thilo Köhler<sup>2</sup> and  
José Luis Martínez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro  
Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3,  
Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Molecular Medicine,  
University of Geneva, 1, rue Michel Servet, 1211  
Geneva 4, Switzerland.

## Summary

**It is generally assumed that acquisition of antibiotic resistance leads to non-specific fitness costs. We have tested the alternative hypothesis that acquisition of antibiotic resistance may not always produce a general burden to the microorganisms, as measured in competition tests, but rather lead to specific changes in bacterial physiology. To this end we studied the effect of overproducing the multidrug efflux pump MexEF-OprN on *Pseudomonas aeruginosa* due to a constitutive activation of MexT, the transcriptional activator of the *mexEF-oprN* genes. We found that overexpression of MexEF-OprN does not cause a significant decrease in *P. aeruginosa* fitness in classical competition tests, indicating the absence of a large metabolic burden and that any possible negative effects might be observed only under specific conditions. Transcriptomic analyses revealed that overexpression of MexEF-OprN results in reduced expression of several quorum-sensing regulated genes. We traced back this phenotype to a delay in PQS production due to extrusion of kynurenine, a PQS precursor, through the efflux pump. Type VI secretion was also impaired. A *Caenorhabditis elegans* model demonstrated that overproduction of MexEF-OprN impairs virulence in *P. aeruginosa*. This**

**effect was mainly due to the activity of the efflux pump, and not to MexT, despite the fact that the latter regulates Type III and Type VI secretion. Altogether, these data indicate that antibiotic resistance can produce modifications in the bacterial regulatory networks with relevant consequences for the bacterial behaviour in specific ecosystems, including the infected host.**

## Introduction

It is generally accepted that acquisition of resistance produces a fitness cost in bacterial populations. When resistance is acquired through mutation of elements with an important physiological role it is expected that such mutations will de-optimize bacterial metabolism and thus affect growth. Consequently, it has been suggested that in the absence of antibiotic selective pressure, resistant bacteria might be outcompeted by their sensitive more fit counterparts (Andersson and Hughes, 2010). Measuring fitness costs by classical competition tests between wild-type and resistant strains (Sander *et al.*, 2002), has proven useful on occasions (Böttger *et al.*, 2005; Böttger and Springer, 2008; Shcherbakov *et al.*, 2010). However, our hypothesis is that antibiotic resistance does not necessarily reduce bacterial fitness as a consequence of a non-specific metabolic burden that would impair bacterial growth under any condition. On the contrary, we believe that acquisition of resistance can produce specific changes in bacterial physiology, including aspects with relevance for the bacterial infective process.

To examine this hypothesis, we used as a model *Pseudomonas aeruginosa*, one of the most important opportunistic human pathogens, and its MexEF-OprN multidrug (MDR) efflux pump (Navon-Venezia *et al.*, 2005). MexEF-OprN belongs to the Resistance Nodulation Division (RND) family of MDR efflux pumps, which are major antibiotic resistance determinants in *P. aeruginosa* (Poole, 2007). During antibiotic therapy, resistance usually arises through overexpression of these elements due to mutations in cognate transcriptional regulators. Efflux pumps are particularly suited to test our hypothesis because, in addition to extruding antibiotics, they may

Received 13 April, 2011; accepted 17 February, 2012. \*For correspondence. E-mail: jlmartez@cnb.csic.es; Tel. (+34) 91 5854542; Fax (+34) 92 5854506. †J.O. and C.A. contributed equally to this work. ‡Present address: Vontz Center for Molecular Studies, Department of Cancer and Cell Biology, University of Cincinnati Medical Center, 3125 Eden Avenue, Cincinnati, OH 45267-0521, USA.

also expel virulence determinants and quorum-sensing (QS) signals (Martinez *et al.*, 2009). Because the expression of efflux pumps is tightly regulated (Grkovic *et al.*, 2002), their overexpression might cause a metabolic imbalance that may finally result in a fitness cost (Sanchez *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004; Piddock, 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* has a large variety of virulence determinants, the production of which is controlled through a number of global regulatory mechanisms. One of these mechanisms is the QS cell-to-cell signalling system. This system operates through a complex hierarchy that comprises two *N*-acylhomoserine lactone regulatory circuits (*las* and *rhl*) and two quinolone signalling molecules, 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) and 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) (Dubern and Diggle, 2008). Because these circuits are interconnected, perturbations of either component will affect the signalling network (Williams and Camara, 2009). Notably, the characterization of a strain that overexpresses the MexEF-OprN efflux pump revealed that this mutant is impaired in production of a number of *rhl*-controlled extracellular virulence factors (Kohler *et al.*, 1997; 2001). These phenotypes were attributed to low intracellular PQS levels caused by extrusion of a signal precursor through the pump. Type III secretion (T3S) is another carefully regulated *P. aeruginosa* virulence determinant (Hauser, 2009). Interestingly, expression of T3S is impaired in a mutant that overexpresses MexEF-OprN (Linares *et al.*, 2005), through a mechanism independent of QS. This suggests that reduced T3S is not due to the increased expression of MexEF-OprN, a possibility that was demonstrated later in an independent investigation (see below).

The expression of *mexEF-OprN* is regulated by a LysR-type transcriptional activator, MexT. Natural isolates of *P. aeruginosa* can present two *mexT* alleles, harbouring one or two copies of an 8 bp repetition, which results in a frameshift that converts the inactive form of MexT to the active form (Maseda *et al.*, 2000). Early studies on mutants overexpressing MexEF-OprN due to MexT activation suggested that this transcriptional activator regulates the expression of additional genes (Kohler *et al.*, 1999). Two recently published articles have addressed the potential MexT regulon by utilizing a *P. aeruginosa* strain that overexpresses an active copy of MexT from a plasmid (Tian *et al.*, 2009a,b). From these studies it was concluded that the MexT regulon is likely involved in broad-spectrum detoxification in *P. aeruginosa* and that MexT seems to be indirectly responsible for the decreased expression of T3S. While this approach is highly valuable to delimit the potential MexT targets, expression of MexT from a plasmid does not reflect the mechanism by which MexT activation leads to overexpression of MexEF-OprN and hence to antibiotic resis-

tance in clinical settings; therefore, it may not be suitable for assessing fitness costs. Furthermore, the fact that some transcriptional regulators can be both positive and negative regulators of the same gene depending on their concentration highlights the need of performing these experiments using models as close as possible to natural isolates (Baek *et al.*, 2011).

To test the effect of MexEF-OprN overexpression on *P. aeruginosa* fitness, we utilized a set of mutants that allowed us to distinguish the effects caused by overproduction of the pump from those caused by activation of the MexT regulator. We found that although MexEF-OprN overexpression does not cause a significant decrease in *P. aeruginosa* fitness when measured using classical competition tests, it led to several changes in the *P. aeruginosa* transcriptome. Overexpression of the efflux pump caused a delay in the production of PQS, and consequently affected the expression of QS-regulated genes, most likely due to the extrusion of kynurenine, a PQS and HHQ precursor. This effect was independent of MexT activity. We found as well that MexT regulates Type VI secretion (T6S) independently from the activity of the efflux pump. Finally, we found that MexEF-OprN-overproduction compromises the virulence of *P. aeruginosa* in a *Caenorhabditis elegans* model. This effect is mainly attributable to the activity of the efflux pump and not to a direct role of MexT in *P. aeruginosa* virulence.

## Results

### *The strain PT149 overexpresses MexEF-OprN due to MexT activation*

To have a better insight on the molecular basis of MexEF-OprN overexpression in strain PT149, the genes *mexT* and *mexS*, and the promoter region of *mexT*, were amplified by PCR and sequenced. The only change observed in PT149 in comparison with the wild-type strain PT5 was the deletion of one copy of an 8 bp repetition, a deletion that is known to convert the inactive allele of MexT to the active one (Maseda *et al.*, 2000). The expression of *mexE*, *mexF* and *mexT* was measured by real-time RT-PCR in strains PT5 and PT149. Our results show that MexT activation in strain PT149 results in the overexpression of *mexE* and *mexF* ( $112 \pm 6.6$ - and  $78 \pm 5.2$ -fold changes respectively). Opposite to the aforementioned model used by Tian *et al.* (Tian *et al.*, 2009a,b), expression of *mexT* did not change significantly ( $1.7 \pm 0.4$ -fold change).

### *Overexpression of MexEF-OprN does not impair P. aeruginosa growth rate in different growth media*

To investigate whether overexpression of MexEF-OprN constitutes a fitness disadvantage, the wild-type and the

**Table 1.** Growth rates with different media and carbon sources.

Medium utilized	Doubling time (min)		
	Wild type	PT149	PT637
Luria–Bertani (LB) <sup>a</sup>	38 ± 3	37 ± 2	38 ± 2
Synthetic Cystic Fibrosis Medium (SCFM) <sup>a</sup>	31 ± 2	32 ± 2	32 ± 3
M63 + Succinate (10 mM) <sup>a</sup>	46 ± 2	47 ± 2	44 ± 2
M63 + Anthranilate (10 mM) <sup>a</sup>	124 ± 30	138 ± 14	154 ± 16
M63 + L-Tryptophan (10 mM) <sup>b</sup>	277 ± 16	876 ± 276	364 ± 65
M63 + L-Kynurenine (10 mM) <sup>c</sup>	325 ± 5	453 ± 16	345 ± 23

**a.** Determined from cultures grown in duplicate on three different days.

**b.** Determined from cultures grown in triplicate. Representative from at least three independent experiments.

**c.** Determined from cultures grown in two rows of a 96-well plate on three different days.

PT149 strains were grown in Luria–Bertani (LB) medium and in M63 minimal medium with succinate as the sole carbon source. The doubling time was essentially the same for the two strains during logarithmic growth in both media (Table 1). Overexpression of MexEF–OprN has been detected in *P. aeruginosa* CF isolates (Jalal *et al.*, 2000; Wolter *et al.*, 2009); therefore, we examined growth in a recently developed defined medium that mimics the nutritional composition of CF sputum (SCFM) (Palmer *et al.*, 2007). Under these conditions, strain PT149 and the wild-type strain also exhibited similar growth rates (Table 1). Strain PT637, a *mexEΩ*Hg mutant constructed in a PT149 background (Kohler *et al.*, 2001), also showed growth rates similar to those of the wild-type strain (Table 1), suggesting that MexEF–OprN did not influence growth under the tested conditions.

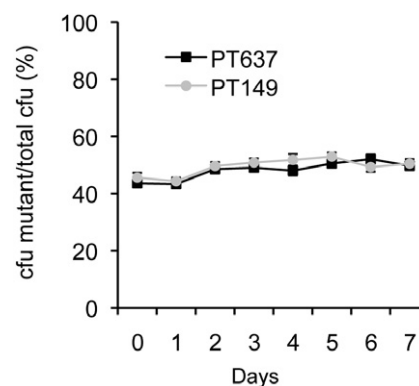
#### Overexpression of MexEF–OprN does not impair *P. aeruginosa* fitness when measured in competition assays

Despite the similar growth rates, acquisition of resistance could result in small fitness costs that would be detectable only when both mutant and wild-type strains are growing together. The relative fitness was explored by means of competitive growth experiments using co-cultures of the wild-type strain and either of the mutants PT149 and PT637 in LB medium. Both mutants could stably coexist with the wild-type strain indicating that neither the presence of a functional MexT protein nor the overexpression of MexEF–OprN diminishes bacterial fitness when measured by classical competition experiments (Fig. 1).

#### Transcriptome profiles in the logarithmic and stationary phases of growth

In order to distinguish the effects derived from the constitutive overexpression of MexEF–OprN from those exclu-

sively due to the role of MexT as a global regulator, we compared the transcriptome profiles of strains PT149 and PT637 with that of the wild type at two different time points during growth in LB medium. We applied a 2.5-fold change cut-off to the data and found that, when compared with the wild type, 46 and 89 genes were differentially regulated in the logarithmic phase of growth in strains PT149 and PT637 respectively. When analysing the transcriptome of cells in the stationary phase of growth, the number of differentially expressed genes in strains PT149 and PT637 relative to the wild-type strain were 149 and 76 respectively. These results are shown in the *Supporting information* (SI), Table S1. Because MexT is a transcriptional activator (Kohler *et al.*, 1997), we expected to see an increased expression in a defined set of genes in the two mutant strains analysed at both time points. Accordingly, we found that expression of genes PA2486, PA2491, PA2493, PA2812, PA2813, PA3229, PA4356 and PA4881 increased in strains PT149 and PT637, both in the logarithmic and in the stationary phase (Table S1). Our results are in agreement with a recent study that explored the MexT regulon in *P. aeruginosa* by overexpressing *mexT* *in trans* in exponentially growing cells (Tian *et al.*, 2009a). We analysed whether overexpression of MexEF–OprN might alter the expression of additional RND-type efflux pumps. We only detected a decrease in expression of *mexGH* at the stationary phase of growth (Table S2). Expression of *oprD2*, a gene encoding for a porin involved in the transport of basic amino acids and dipeptides (Fukuoka *et al.*, 1993), which also serves as the main port of entry for carbapenem and imipenem, is known to decrease in the strain containing the active form of MexT (Masuda and Ohya, 1992; Masuda *et al.*, 1995; Kohler *et al.*, 1999; Masuda *et al.*, 2000; Hocquet *et al.*,



**Fig. 1.** MexEF–OprN overexpression does not produce a detectable fitness cost in *P. aeruginosa*. The relative fitness of each mutant in comparison with the wild-type strain was estimated by competitive growth in co-cultures as the percentage of mutant cells present in the culture at each time point. Neither the mutant overexpressing MexEF–OprN (PT149, grey) nor the one lacking the pump but presenting an active form of MexT (PT637, black) outcompeted the wild-type strain.



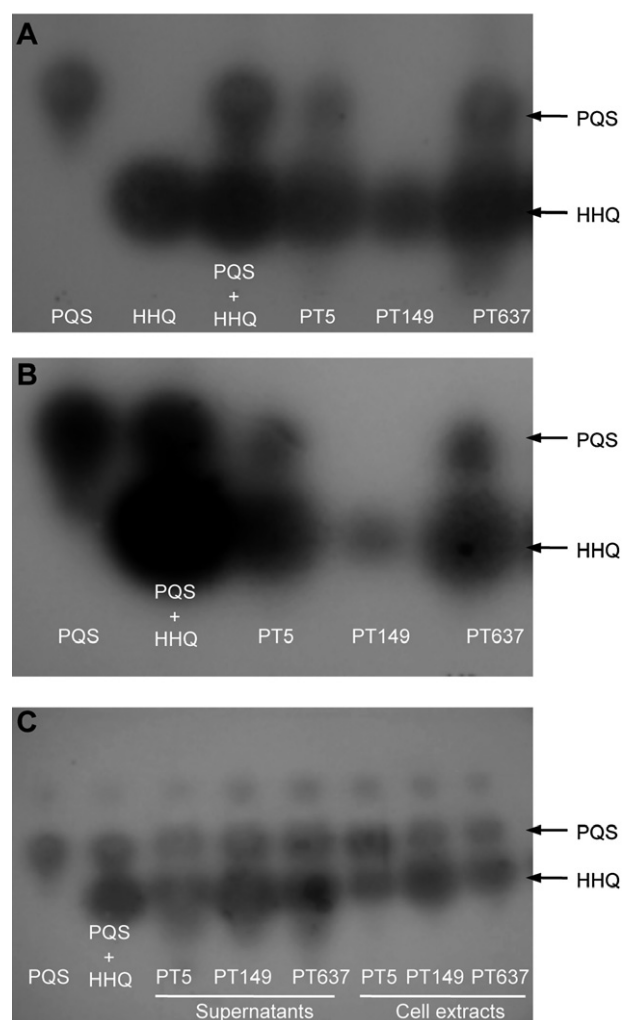
2003). Therefore, to determine if the physiological changes observed in strains PT149 and PT637 could be associated to low OprD2 levels, we included strain PT364, an OprD2 mutant, in our transcriptome analyses. No statistically significant changes in gene expression were observed in either of the two time points analysed (not shown).

*Genes that belong to the QS regulon are inversely regulated during stationary phase in strain PT149*

We compared our transcriptome data with that of two studies that have contributed to define the QS regulon in *P. aeruginosa* (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003) and found that approximately 60% of the genes (86 in total) that were differentially regulated in strain PT149 during the stationary phase of growth belong to the QS regulon and are mostly dependent on the *rhl* system (Schuster *et al.*, 2003) (Table S2). Under laboratory conditions the QS system regulates gene expression primarily at the onset of stationary phase, although some regulation also occurs earlier in growth (Williams and Camara, 2009). We found that expression of two QS-activated operons, *hcnABC* and PA3327-PA3334, decreased exclusively during the logarithmic phase of growth in strain PT149 (Table S2). This suggests that decreased expression of QS-regulated genes may result from the extrusion of a QS-signal precursor via the efflux pump early on during growth.

*PQS production is impaired in strain PT149 but not in strain PT637 during early stationary phase of growth*

We extracted PQS from cell pellets and from cell-free supernatants of strain PT149 in order to test the hypothesis that overexpression of MexEF-OprN results in lower PQS levels. We also included strain PT637 to directly link the results to overexpression of the pump. PQS was not detected in cell extracts or supernatants prepared from strain PT149 in early stationary phase LB cultures (OD<sub>600</sub> of about 2.0) (Fig. 2). In contrast, PQS was present in extracts from strain PT637 (Fig. 2), which has the active form of MexT but lacks *mexE*. This indicates that overexpression of MexEF-OprN is responsible for the observed lack of PQS in strain PT149 independently of MexT activity. The fact that PQS was not detected in the cell-associated extract suggests that PQS itself is not a substrate of the MexEF-OprN efflux pump. To determine whether MexEF-OprN overexpression results in permanently undetectable levels of PQS in strain PT149, we extracted the signal from cultures in late stationary phase (14 h post-inoculation), finding that PQS was present in cellular extracts and culture supernatants from all strains (Fig. 2). This suggests that overexpression of MexEF-OprN causes a delay rather than a complete shutdown of



**Fig. 2.** PQS and HHQ production by the wild-type PT5 and the mutant PT149 and PT637 strains. The analysis was performed by TLC as described in the text. TLC plates were overlaid with soft agar containing the *pqsA* CTX-*lux::pqsA* biosensor strain. After a 5 h incubation period an X-ray film was exposed to the overlay for 2 min and the film was photographed with a digital camera. The positions of the samples containing synthetic PQS 10 mM, 2  $\mu$ l; synthetic HHQ 10 mM, 2  $\mu$ l; synthetic PQS and HHQ 5 mM each, 4  $\mu$ l, and the samples from bacterial cultures (30  $\mu$ l each) are indicated. (A) Supernatants and (B) cell extracts from cultures harvested during early stationary phase. (C) Supernatants and cell extracts from cultures harvested during late stationary phase. The positions in the TLC plate of the PQS and the HHQ spots are highlighted with arrows. The experiment was repeated at least five times with reproducible results.

PQS production. Our results indicate that this delay is probably caused by the constant extrusion of a PQS precursor through MexEF-OprN.

*HHQ is detected in strain PT149 during early stationary phase of growth*

HHQ is the immediate PQS precursor (Deziel *et al.*, 2004) and can be detected by the same biosensor-based



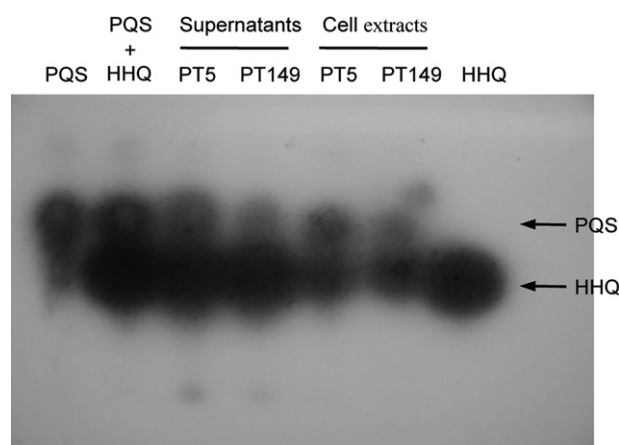
assay as PQS (Diggle *et al.*, 2007). In contrast with the absence of PQS in strain PT149, we were able to detect HHQ in cell extracts and in supernatants from early stationary phase LB cultures of this strain (Fig. 2). While the biosensor-based assay is not a quantitative method, the low intensity of the spot corresponding to HHQ in the cell extract suggests that the cell-associated HHQ levels in PT149 are lower than those found in the wild-type and in the PT637 strains (Fig. 2). On the contrary, the intensity of the spot corresponding to extracellular HHQ was similar in all three strains. The fact that HHQ is easily detectable in the supernatant of strain PT149 suggests that HHQ could be the PQS precursor being extruded by MexEF-OprN. Given the low cell-associated HHQ levels found in PT149, the possibility exists that an HHQ (and therefore a PQS) precursor is also being extruded through MexEF-OprN.

#### *PQS production is restored when PT149 is grown in LB supplemented with anthranilate*

In *P. aeruginosa* HHQ is formed via the condensation of anthranilate and a  $\beta$ -keto-fatty acid (Bredenbruch *et al.*, 2005). When growing in LB medium, *P. aeruginosa* produces anthranilate mainly from the anthranilate branch of the kynurenine pathway of tryptophan degradation (the pathway goes from tryptophan to *N*-formyl-kynurenine to kynurenine to anthranilate) (Farrow and Pesci, 2007). To determine if MexEF-OprN is extruding an HHQ and PQS precursor, we supplemented LB medium with 1 mM anthranilate. Supplementation of LB with anthranilate did not affect growth of either strain (data not shown). We detected PQS in cellular extracts and supernatants from cultures in early stationary phase of both PT149 and the wild-type strain (Fig. 3). In addition, the levels of HHQ in the cellular extracts from strain PT149 seemed to be higher than those detected in cells grown in non-supplemented LB (Figs 2 and 3). While HHQ levels appear to be restored by addition of anthranilate, the possibility that HHQ is also extruded through MexEF-OprN is not completely disproved by these findings.

#### *Expression of QS-regulated genes is restored in strain PT149 in the presence of anthranilate*

We used RT-PCR to measure the expression of selected QS-regulated genes (*hcnABC* and *pqsABCDE*) that appeared downregulated in PT149 in our transcriptome analysis. We supplemented LB with 1 mM anthranilate and compared the results with those obtained in unsupplemented LB. The *hcnABC* operon is involved in cyanide production and *pqsABCDE* is responsible for HHQ and PQS synthesis; both operons were downregu-

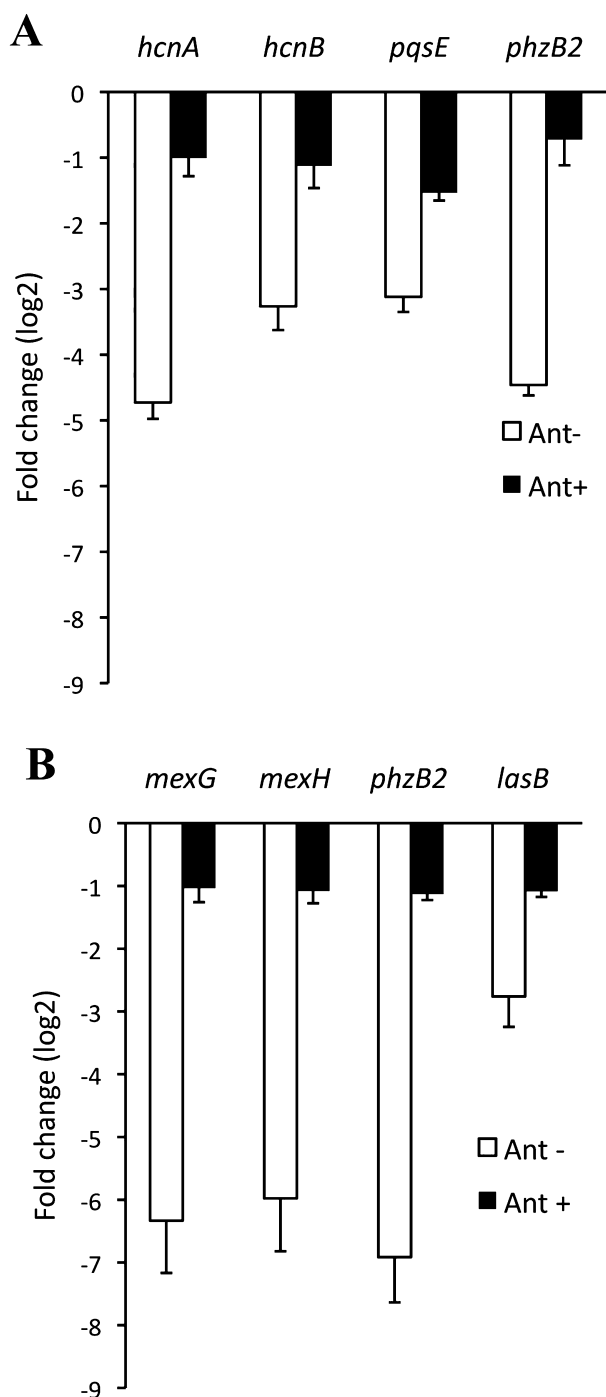


**Fig. 3.** Effect of anthranilate supplementation on PQS and HHQ production by the wild-type PT5 and the mutant PT149. The strains were grown on LB supplemented with 1 mM anthranilate, and the analysis was performed by TLC. The TLC plate was overlaid with soft agar containing the *pqsA* CTX-*lux::pqsA* biosensor strain as described for Fig. 2. The positions of the samples containing synthetic PQS 10 mM, 2  $\mu$ l; synthetic HHQ 10 mM, 2  $\mu$ l; synthetic PQS and HHQ 5 mM each, 4  $\mu$ l, and the samples from bacterial cultures (30  $\mu$ l each) are indicated. The positions in the TLC plate of the PQS and the HHQ spots are highlighted with arrows. The experiment was repeated at least five times with reproducible results.

lated during the logarithmic phase of growth. As shown in Fig. 4A, the expression of both operons increased in the presence of anthranilate by at least threefold, although the levels of expression did not reach those observed in the wild-type strain. We also measured expression of the *mexGHI* operon, encoding the MexGHI MDR efflux pump, the *phzABCDEFG2* operon, coding for enzymes involved in phenazine biosynthesis and the *lasB* gene coding for the LasB elastase, all of which were downregulated in stationary phase in strain PT149 compared with the wild type. As shown in Fig. 4B, the expression of both operons and of *lasB* was restored to wild-type levels upon anthranilate addition.

#### *Strain PT149 has a growth defect when using the HHQ and PQS precursors tryptophan or L-kynurenine, as the sole carbon source*

We approached the possibility that MexEF-OprN is extruding anthranilate by growing strain PT149 in minimal medium with anthranilate as the sole carbon source. We expected to see a growth defect if this was the case; however, we found that the doubling time of PT149 was similar to that of the wild type and PT637 under these conditions (Table 1). To determine if anthranilate precursors from the kynurenine pathway of tryptophan degradation are substrates of MexEF-OprN, we grew the strains in minimal medium with tryptophan or with *L*-kynurenine as the sole carbon source (*N*-formyl-kynurenine is not com-

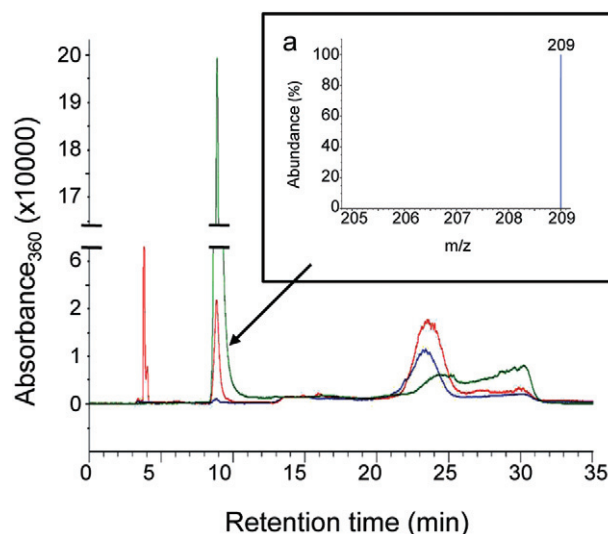


**Fig. 4.** Effect of anthranilate on the expression of genes downregulated in the mutant overexpressing MexEF-OprN. The expression of genes downregulated in the strain PT149, which overproduces MexEF-OprN, at exponential phase (A) or stationary phase (B) was measured by real-time RT-PCR in cultures supplemented with 1 mM anthranilate. The relative level of expression is expressed as the fold change (log<sub>2</sub>) with respect to the wild-type strain PT5. White bars, bacteria growing without anthranilate, black bars, bacteria growing with anthranilate. As shown, anthranilate restores the expression of genes downregulated in the mutant overexpressing MexEF-OprN.

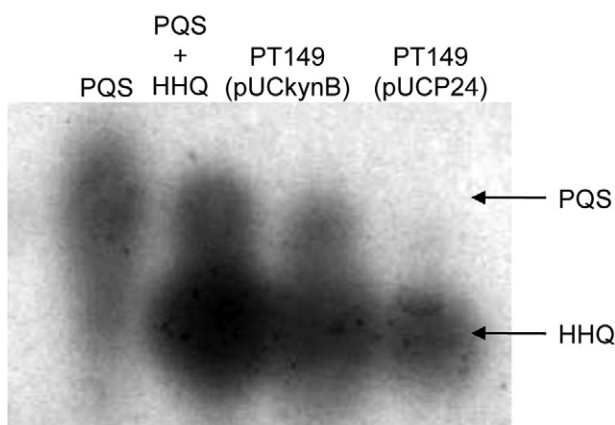
mercially available). We observed a growth defect with both tryptophan and *L*-kynurenine in strain PT149, while PT637 had doubling times similar to that of the wild-type strain with these carbon sources (Table 1). These results suggest that a precursor needed to supply anthranilate for HHQ and PQS synthesis is being extruded by MexEF-OprN in PT149. The candidates include *N*-formyl-kynurenine and/or *L*-kynurenine.

#### *MexEF-OprN extrudes kynurenine when growing with tryptophan as the sole carbon source*

We decided to analyse by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) the supernatant of *P. aeruginosa* cultures growing with tryptophan as the sole carbon source for the presence of kynurenine. We observed a peak corresponding to *L*-kynurenine in the PT149 samples while this peak was absent in PT5 samples (Fig. 5) and PT637 (not shown). The *L*-kynurenine concentration in the PT149 supernatant was in the micromolar range. These results further support that *L*-kynurenine is extruded by MexEF-OprN and explain the growth defect of strain PT149 when provided with tryptophan or kynurenine as the sole carbon sources.



**Fig. 5.** MexEF-OprN extrudes kynurenine. The presence of *L*-kynurenine in the supernatants of the strains PT149 (MexEF-OprN overproducer) and PT5 (wild-type) was analysed by HPLC-MS. In green, a standard of pure *L*-kynurenine (50  $\mu$ M). As shown a peak co-eluting with *L*-kynurenine was detected in the supernatants from PT149 cultures (red), whereas PT5 supernatants (blue) did not contain relevant amounts of *L*-kynurenine. Mass spectrum of this peak (Box a) was identical for the three samples (standard *L*-kynurenine, PT149 supernatants and PT5 supernatants).



**Fig. 6.** *kynB* expression from a plasmid restores the production of PQS in PT149. The analysis was performed by TLC as described in the text. TLC plates were overlaid with soft agar containing the *pqsA* CTX-*lux::pqsA* biosensor strain. After a 5 h incubation period an X-ray film was exposed to the overlay for 2 min and the film was photographed with a digital camera. The positions of the samples containing synthetic PQS 10 mM, 2  $\mu$ l; synthetic PQS and HHQ 5 mM each, 4  $\mu$ l, and the samples from bacterial cultures (30  $\mu$ l each) are indicated. As shown, the expression *in trans* of *kynB* restores the production of PQS in the PT149 mutant strain. The positions of PQS and HHQ are shown with arrows.

#### *In trans* expression of *kynB* restores PQS production in PT149

Because *L*-kynurenine is a precursor of PQS, the observed defect in the QS response of the MexEF-OprN overproducing mutant might be due to a reduced intracellular concentration of *L*-kynurenine. To analyse this possibility, we expressed a plasmid-encoded *kynB* gene in the PT149 mutant and determined the presence of PQS in the cell culture supernatants. KynB is a kynurenine formidase responsible for synthesizing *L*-kynurenine from *N*-formyl-kynurenine (Kurnasov *et al.*, 2003). If the intracellular amount of *N*-formyl-kynurenine is not at limiting concentration, the expression of KynB might allow the synthesis of higher amounts of *L*-kynurenine from this precursor, thus compensating its extrusion through MexEF-OprN. As shown in Fig. 6, *in trans* expression of *kynB* restored PQS production in the PT149 mutant, further supporting that MexEF-OprN effluxes *L*-kynurenine.

It has been recently described that the transcriptional regulator KynR mediates the kynurenine-dependent expression of the kynurenine pathway (Knoten *et al.*, 2011). If *in trans* expression of *kynB* increases the intracellular concentration of kynurenine, this can increase *kynR* expression. Consistent with this hypothesis, real-time RT-PCR analyses showed that *kynR* expression is higher in the strain PT149 (pUCKynB) than in the control strain PT149 (pUCP24) ( $2.1 \pm 0.2$ - and  $3 \pm 0.3$ -fold

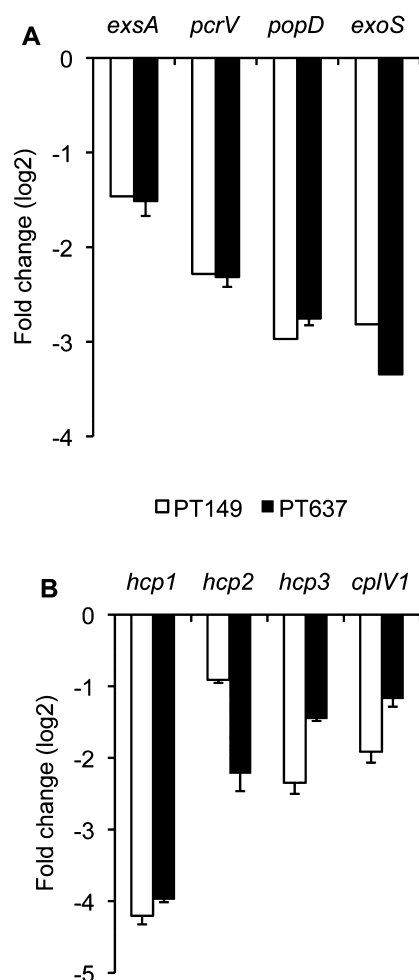
change in exponential and stationary growth phases respectively).

#### *MexT* regulates *P. aeruginosa* protein secretion independently of MexEF-OprN

It has been previously stated that MexEF-OprN overexpression is associated with a reduction on T3S in *P. aeruginosa* (Linares *et al.*, 2005). Further work using a strain overexpressing a plasmid-encoded MexT regulator suggested that this impairment was dependent on MexT (Tian *et al.*, 2009a). Work by Jin *et al.* further confirmed the involvement of MexT in regulation of T3S, which occurs via MexS and PtrC (Jin *et al.*, 2011). As stated in the introduction, overexpression of MexEF-OprN in clinical isolates is not due to overexpression of MexT, but to the shift of MexT from an inactive to an active allele. We thus tested the expression of different components of the T3SS by real-time RT-PCR in mutants PT637 and PT149 under growth conditions that induce T3S. In agreement with previous studies, the expression of effector genes represented by *exoS*, structural genes *pcrV* and *popD* and the master regulator of the system *exsA*, was lower in both mutants (Fig. 7A), indicating that MexT regulates T3S independently of MexEF-OprN. Besides this effect on T3S, our transcriptomic analysis showed that the expression of genes coding for structural and effector proteins of the *P. aeruginosa* Type VI Secretion System (T6SS) were lower in PT637 and in PT149 than in the wild-type strain. In order to validate these results, the expression of *hcp1*, *hcp2*, *hcp3* (effector secreted proteins) and *clpV1* (T6S ATPase) was tested by real-time RT-PCR at mid-logarithmic phase. The results confirmed the repressed state of T6SS in the strains having an active MexT (PT149, PT637), as compared with the wild-type strain (Fig. 7B).

#### *MexEF-OprN* overexpression impairs virulence of *P. aeruginosa* independently of MexT

It was previously demonstrated that a mutant overproducing MexEF-OprN is less virulent than its wild-type parental strain in a *Dictyostelium discoideum* model (Cosson *et al.*, 2002). However, information is lacking on which elements are mainly responsible for this reduced virulence. Because both T3S and QS-regulated virulence determinants are relevant in the pathogenic behaviour of *P. aeruginosa*, we compared the virulence of the different mutants (PT149 and PT637) in a *C. elegans* virulence model system (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999a,b; Aballay and Ausubel, 2002). Contrary to some *C. elegans* models based on the use of non-reproductive worms that serve to establish killing curves, in our model *C. elegans* can multiply (Sanchez *et al.*, 2002; Navas



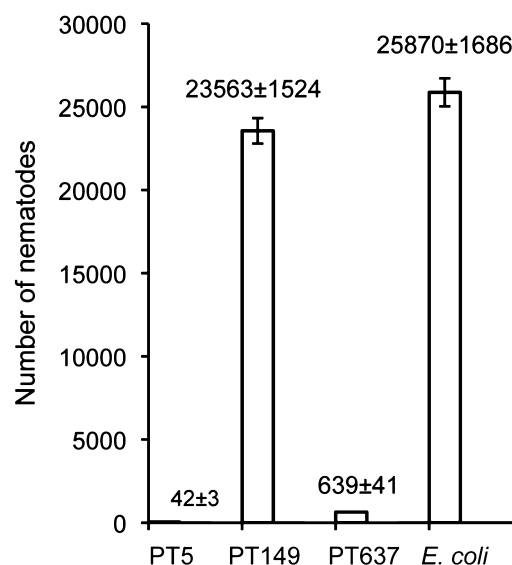
**Fig. 7.** Expression of T3SS and T6S genes by the wild-type PT5 and the mutants PT149 and PT637. The expression of genes coding for different components of the T3SS regulon (A) and T6SS apparatus (B) was measured by real time RT-PCR. White bars, PT149, black bars PT637. As shown the expression of both secretion systems T3SS and T6SS is lower in the mutants than in the wild-type strain.

*et al.*, 2007). This allows a better discrimination of the virulence potential of *P. aeruginosa* because our analysis includes the effect of the pathogen on the reproductive efficacy of *C. elegans*. It can be considered that the model based in killing curves reflects the mortality associated with *P. aeruginosa* infections while the model based in reproductive worms serves to evaluate morbidity as well. As shown in Fig. 8, PT149 was completely avirulent in this model. We found that strain PT637, which carries an active form of MexT but does not express MexEF-OprN, impairs the growth of *C. elegans*, indicating that this mutant is still virulent in this model system despite its impairment in T3S and T6S. This indicates that, at least in our model system, the impairment of virulence associated with expression of MexEF-OprN is mainly due to the

activity of the pump itself, while the contribution of MexT to this impairment is minor.

## Discussion

Efflux pumps can accommodate a wide variety of substrates including nutrients, metabolites and toxic substances that bacteria encounter in their surrounding environment (Martinez *et al.*, 2009). Hence, the impact on fitness derived from increased expression of efflux pumps might vary in different organisms and ecosystems and can be highly dependent on the pump involved (Sanchez *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008; Warner *et al.*, 2008; Stickland *et al.*, 2010). To determine the impact that overexpression of MexEF-OprN may have on the fitness and on the physiology of *P. aeruginosa*, we characterized strain PT149, a mutant that overexpresses this efflux pump due to the constitutive activation of the MexT transcriptional regulator. As an initial assessment of fitness, we grew PT149 in different culture media and observed no impact on growth rate. Furthermore, the wild type did not outcompete PT149 in mixed culture competition experiments in LB medium (Fig. 1). Therefore, MexEF-OprN overexpression does not have a significant effect on *P. aeruginosa* fitness when measured in head-to-head competition tests in the conditions used in this study.



**Fig. 8.** Effect of overexpressing MexEF-OprN on *P. aeruginosa* on virulence by using a *C. elegans* model. *C. elegans* was grown under conditions of slow-killing in plates containing pre-seeded bacteria. As shown, the mutant PT149, which overexpresses MexEF-OprN allows the growth of the nematode to the levels observed when the worm was fed on non-pathogenic *Escherichia coli*, indicating that this mutant is fully avirulent. In contrast, the mutant PT637 presenting the active form of MexT, but lacking MexEF-OprN remained virulent, although it was more permissive to *C. elegans* growth than the wild-type strain.



Over the years, different studies have suggested that MexEF-OprN overexpression interferes with the *rhl* QS system due to low intracellular PQS levels (Kohler *et al.*, 1997; 2001; Ramsey and Whiteley, 2004). Our transcriptomic analysis indeed demonstrated that expression of 86 QS-regulated genes decreased in stationary phase in strain PT149. We found that overexpression of the pump results in a delay in PQS production as no PQS was detected in strain PT149 during early stationary phase but was subsequently detected in late stationary phase. In addition, we showed that overexpression of the pump decreases the cell-associated levels of HHQ, the direct PQS precursor and a QS signalling molecule (Dubern and Diggle, 2008). HHQ is synthesized from the PqsABCDE-mediated condensation of anthranilate and a  $\beta$ -keto-fatty acid (Gallagher *et al.*, 2002; Bredenbruch *et al.*, 2005). Farrow *et al.* have demonstrated that *P. aeruginosa* synthesizes anthranilate from the kynurenine pathway of tryptophan degradation when growing in LB (Farrow and Pesci, 2007). PT149 growth defects observed with tryptophan or kynurenine as the sole carbon sources prompted us to analyse supernatants obtained from PT149 and PT5 growing with tryptophan; we found that *L*-kynurenine is extruded by PT149 under these conditions (Fig. 5). Because the only efflux pump overexpressed in PT149 is MexEF-OprN (Table S2), this supports that *L*-kynurenine is a substrate of MexEF-OprN. The recovery of PQS production in LB by a PT149 strain expressing *in trans* the enzyme responsible for converting *N*-formyl-kynurenine to *L*-kynurenine further confirmed that *L*-kynurenine is a PQS and HHQ precursor extruded by MexEF-OprN (Fig. 6). We did not investigate the possibility that MexEF-OprN can also extrude fatty acids. However, the fact that we were able to restore PQS and HHQ production, as well as expression of *lasB* and the *hcnABC*, *pqsABCDE*, *mexGHI* and *phzABCDEFG2* operons, by supplementing LB cultures with anthranilate, speaks against this possibility (Figs 3B and 7). During the preparation of this manuscript Lamarche *et al.* (Lamarche and Deziel, 2011) published a study that demonstrates that MexEF-OprN extrudes HHQ, thus causing a defect in PQS production. These findings are in agreement with our detection of extracellular HHQ in strain PT149 and indicate that *L*-kynurenine is not the unique natural substrate of MexEF-OprN. The authors were able to achieve only partial recovery of PQS production upon exogenous HHQ supplementation. This may be explained by the fact that *L*-kynurenine is being extruded by the pump thus affecting PQS production.

Our study allowed us to separate the physiological impact of MexT activation from MexEF-OprN overexpression. We found that MexT affects expression of genes coding for elements of the T6SS. T6SS is widespread in the bacterial kingdom and have been impli-

cated in virulence of human, animal and plant pathogens. *P. aeruginosa* carries three T6S operons, named HSI for Hcp Secretion Island, and they are regulated independently of each other (Mougous *et al.*, 2006). While HSI-I is transcriptionally regulated by the *retS/ladS* system (Mougous *et al.*, 2006), HSI-II and HSI-III are regulated by LasR and MvfR, which are QS activators (Lesic *et al.*, 2009). In our transcriptional analysis we found that HSI-I and HSI-II are expressed at lower levels in mutants PT149 and PT637 compared with the wild-type strain, whereas the changes in expression of HSI-III were below the threshold used in our analysis (Table S3). However, our results with real-time RT-PCR demonstrated that the expression of all three *P. aeruginosa* T6SS were lower in PT149 and PT637 in comparison with the wild-type strain (Fig. 7B). Because MexT is an activator, the observed effect of MexT is likely indirect. Given that both T3S and T6S systems are regulated by the *retS/ladS* system, it would be worth studying whether the effect of MexT on protein secretion is mediated through this two-component regulatory system.

Because we observed a decrease in virulence in a *C. elegans* model when MexEF-OprN is overexpressed, it is very likely that overexpression of MexEF-OprN will also reduce virulence in other type of infections. From the pathogen's perspective this would be advantageous as it reduces the risk of killing the host thus eliminating the nutrient source, particularly during the course of chronic infections. While this study established that constitutive activation of this system does not represent an immediate physiological burden to *P. aeruginosa*, additional studies will be necessary to determine if this is also the case in different environmental conditions, including microbial communities and different types of infections.

Altogether, the results presented in this article support the notion that antibiotic resistance does not always produce a non-specific burden reflected in bacterial growth impairment as supposed (Andersson, 2006), but rather specific changes on regulatory and metabolic networks with relevance for the virulence of bacterial pathogens. While classical competition tests have proven to be useful for analysing fitness costs in several occasions (Bottger *et al.*, 2005; Bottger and Springer, 2008; Shcherbakov *et al.*, 2010), novel approaches as those described in our article, are required to analyse in depth the effect of acquiring resistance in the behaviour of bacterial pathogens (Martinez *et al.*, 2011).

## Experimental procedures

### Strains and growth conditions

Bacterial strains used in this study are described in Table 2. Bacteria were routinely grown in LB medium (Pronadisa) at

**Table 2.** Bacterial strains used in this study.

Strains	Relevant genotype and phenotype	Source or reference
<i>P. aeruginosa</i> PT5	PAO1, wild type	Köhler laboratory collection Kohler <i>et al.</i> (2000)
<i>P. aeruginosa</i> PT149	PT5 <i>nfxC</i> ; overproduces MexEF-OprN.	Kohler <i>et al.</i> (1997)
PT149 (pUCP24)	PT149 carrying the pUCP24 empty vector.	This study
PT149 (pUCkynB)	PT149 expressing <i>kynB</i>	This study
<i>P. aeruginosa</i> PT637	PT149 <i>mexE::ΩHg</i> , does not produce MexEF-OprN.	Kohler <i>et al.</i> (2001)
<i>P. aeruginosa</i> PT364	PT5 <i>oprD::ΩTc</i>	Epp <i>et al.</i> (2001)
<i>E. coli</i> OP50	Wild type, for maintenance of <i>C. elegans</i>	Martinez laboratory collection
<i>E. coli</i> One shot Omnimax TM	F' { <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , <i>lacZΔM15</i> , Tn10(TetR), $\Delta(ccdAB)$ }, <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr)$ , <i>hsdRMS-mcrBC</i> , $\Phi80(lacZ)\Delta M15$ , $\Delta(lacZYA-argF)U169$ , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>tonA</i> , <i>panD</i>	Invitrogen

37°C. For growth experiments in minimal medium with defined carbon sources M63 medium (US Biological, Swampscott, MA, USA) supplemented with 1 mM MgSO<sub>4</sub> was used. Anthranilic acid (Sigma) was prepared as a 25 mM stock solution and the pH was adjusted to 7.0 with 2.0 M KOH. *L*-tryptophan, *L*-kynurenine sulphate salt and sodium succinate were purchased from Sigma. The media were filter sterilized through a 0.22 µm pore size filter. The synthetic cystic fibrosis sputum medium (SCFM) was prepared as previously described (Palmer *et al.*, 2007). Cells were grown in 100 ml flasks containing 25 ml of medium shaking at 250 r.p.m. at 37°C. Growth curves with kynurenine were performed in a TECAN Infinite 200 plate reader. Doubling times were determined from cultures grown in duplicate on three different days unless noted otherwise. For the nematode-killing assay *P. aeruginosa* strains were grown in Brain Heart Infusion (BHI) medium (Oxoid).

#### Determination of bacterial fitness

Fitness cost was determined by direct competition between PT149 or PT637 against the wild-type strain. Each strain was grown individually overnight. The cultures were diluted 1000-fold and mixed cultures containing equivalent amounts of the wild-type strain and each mutant were incubated at 37°C in antibiotic-free LB medium; every 24 h 25 µl of the grown culture was inoculated into 25 ml of fresh LB medium for growth. In order to determine the viable cells, the culture was serially diluted 1/10 in saline solution and dilutions 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> and 10<sup>-7</sup> were plated every 24 h in duplicate on antibiotic-free LB agar to count the number of colonies; in parallel, plates containing antibiotics that allow the growth of the mutant strains and impede the growth of wild-type cells (15 µg ml<sup>-1</sup> of chloramphenicol and 3.5 µg ml<sup>-1</sup> of imipenem for PT149 and PT637 selection respectively) were plated using the same dilutions mentioned before. The number of wild-type cells was calculated as the total number of bacterial cells minus the number of antibiotic-resistant cells and the results were expressed as percentage of drug-resistant cells with respect to the wild-type strain. The experiments were performed in triplicate with three independent cultures.

#### Transcriptome experiments

PT5, PT149, PT637 and PT364 cultures were grown in LB medium as described above. The cells were subcultured

once and harvested for RNA extraction during mid-logarithmic phase at an OD<sub>600</sub> of 0.5–0.6 and at early stationary phase at an OD<sub>600</sub> of 2.0. RNA was isolated as described (Schuster *et al.*, 2003). Each experiment was done in triplicate from samples prepared on different days. cDNA synthesis, cDNA fragmentation, end-labelling, hybridization and processing of *P. aeruginosa* Affimetrix GeneChips were performed at the Genomics Unit at the Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, Spain).

#### Real-time RT-PCR assays

RNA was isolated in the same conditions used for the transcriptome experiments, as described (Schuster *et al.*, 2003). cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems). Real-time RT-PCR was carried out on ABI prism 7300 and Power SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems) was used with 100 nM of primers on 50 ng of initially isolated RNA in triplicate inter and intra assay. *rpsL* was used as housekeeping gene in order to normalize the real-time RT-PCR results and the amount of each RNA was calculated following the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method (Livak and Schmittgen, 2001). The oligonucleotides used in the real-time RT-PCR experiments are listed in Table S4.

#### Transcriptional analysis of Type III Secretion System components

T3S was induced as described before (Dacheux *et al.*, 2001). Briefly, bacteria were grown in LB broth overnight at 37°C with agitation. The cultures were diluted in a calcium depleted medium (5 mM EGTA and 20 mM MgCl<sub>2</sub>) at an optical density at 600 nm of 0.1 and incubated at 37°C for 4 h. Ten millilitres of culture were used for RNA isolation and real-time RT-PCR procedures were performed as described above. The oligonucleotides used are shown in Table S4.

#### PQS and HHQ extraction and detection

PQS and HHQ were extracted from cultures growing in 25 ml of medium as described for growth experiments at early stationary phase (approximately 6 h post-inoculation) and late stationary phase (14 h post-inoculation) as previously

described (Collier *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 2007). Briefly, 11 ml of each culture was centrifuged at 10 000 r.p.m. at 4°C for 10 min. At this point, the supernatants and the cellular pellets were separated to allow 2-alkyl-4-quinolone (AHQ) extraction from each. Extracts were analysed by thin-layer chromatography using Silica gel 60  $F_{254}$  plates (Merck) [activated at 100°C after soaking in a 5% (wt/vol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solution] and a mixture of 95:5 dichloromethane : methanol as the mobile phase (Fletcher *et al.*, 2007). PQS and HHQ standards were purchased from Paul Williams's laboratory at the University of Nottingham. The *P. aeruginosa* PAO1 *pqsA* CTX-*lux::pqsA* biosensor strain was used to detect PQS and HHQ in the TLC plates with the agar overlay method (Diggle *et al.*, 2007). The results were visualized by exposing X-ray film to the overlay for 2 min. Each experiment shown was repeated at least five times.

#### Determination of kynurenine by HPLC-MS

Supernatants of logarithmic phase cultures ( $\text{OD}_{600}$  0.2–0.3) grown in M63 with tryptophan as the sole carbon source were lyophilized and resuspended in 1 ml of methanol (HPLC grade). The samples were analysed at Laboratorio de Cromatografía-Sidl from the Universidad Autónoma de Madrid by HPLC-MS. A C18 (150 × 4.6 mm, 4 µm) column was used for the analysis. The mobile phase was a binary solvent system, solvent A was ammonium acetate (10 mM, pH 6.8) and solvent B was methanol. The flow rate was 0.5 ml min<sup>-1</sup> and the wavelength of the UV detector was set at 360 nm. The MS analysis was done in Selected Ion Monitoring (SIM) mode set for detection of positive ions at 209 for *L*-kynurenine. The settings used are as follows: fragmentor: 60 V, drying gas flow: 10 l min<sup>-1</sup>, nebulizer pressure: 60 psig, drying gas temperature: 300°C, vaporizer temperature: 250°C, capillary voltage: 2000 V, corona current: 5 µA, charging voltage: 2000 V. *L*-kynurenine (Sigma) was used as a standard. The results are representative from three independent determinations. Each sample was injected several times into the column.

#### *kynB* in trans complementation

Plasmid pUCKynB, containing the *kynB* gene (PA2081) under control of the *lac* promoter on pUCP24 was obtained by PCR amplification of genomic DNA of *P. aeruginosa*. Oligonucleotides *kynB*FcoRI-*kynB*RbBamHI (Table S4) generated a band of 721 pb. The amplified band was ligated into pGEM-T Easy (Promega) and sequenced. The DNA insert was recovered by EcoRI and BamHI restriction digestion and ligated into the EcoRI/BamHI-digested pUCP24 vector. The ligation product was used for transforming *Escherichia coli* One shot Omnimax (Invitrogen) competent cells obtained as described in Sambrook and Russell (2001), and plated in LB containing 15 µg ml<sup>-1</sup> of gentamycin. The resulting plasmid pUCKynB was introduced in *P. aeruginosa* PT149 by transformation. Selection was performed in LB plates containing 50 µg ml<sup>-1</sup> of gentamycin. The presence of HHQ and PQS in the supernatants of *P. aeruginosa* cultures was determined as described above.

#### Nematode-killing assay

The nematode killing assay was performed as described previously (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999) with modifications (Ruiz-Diez *et al.*, 2003; Navas *et al.*, 2007). Fifty microlitres of an overnight BHI culture of each bacterial strain were seeded onto a 12-well plate, in which each well has been previously filled with 1.5 ml of Potato-dextrose-agar (PDA). Seeded plates were incubated at 37°C for 24 h and then stored at room temperature for 12 h. Nematodes were washed and purified by passing them through a sterile-sand filter and finally suspended in sterile bidistilled water. Five gravid women were placed in each well. Plates were incubated at 20°C and every day the number of nematodes was scored. The results are expressed as a final state of the population after 7 days of bacteria-nematode co-incubation. Six independent assays, with three replicates each were performed.

#### Acknowledgements

We would like to thank Paul Williams and Matthew Fletcher for sending us the *P. aeruginosa pqsA* CTX-*lux::pqsA* biosensor strain, to Max Chavarría for his help with the TLC experiments and to Trinidad Cuesta for technical assistance. Work in our laboratories is supported by grants BIO2008-00090, BIO2011-25255 and BFU2009-07009/BMC from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and HEALTH-F3-2011-282004 (EVOTAR) and HEALTH-F3-2010-241476 (PAR) from European Union. J.O. is the recipient of a fellowship from Programa Beca Chile CONICYT.

#### References

- Aballay, A., and Ausubel, F.M. (2002) *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **5**: 97–101.
- Alonso, A., Morales, G., Escalante, R., Campanario, E., Sastre, L., and Martinez, J.L. (2004) Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* **53**: 432–434.
- Andersson, D.I. (2006) The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* **9**: 461–465.
- Andersson, D.I., and Hughes, D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* **8**: 260–271.
- Baek, C.H., Kang, H.Y., Roland, K.L., and Curtiss, R., 3rd (2011) Lrp acts as both a positive and negative regulator for type 1 fimbriae production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS ONE* **6**: e26896.
- Böttger, E.C., and Springer, B. (2008) Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *Eur J Pediatr* **167**: 141–148.
- Böttger, E.C., Pletschette, M., and Andersson, D. (2005) Drug resistance and fitness in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Dis* **191**: 823–824. author reply 824.
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Muller, R., and Haussler, S. (2005) Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *J Bacteriol* **187**: 3630–3635.



- Collier, D.N., Anderson, L., McKnight, S.L., Noah, T.L., Knowles, M., Boucher, R., *et al.* (2002) A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* **215**: 41–46.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., *et al.* (2002) *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* **184**: 3027–3033.
- Dacheux, D., Attree, I., and Toussaint, B. (2001) Expression of ExsA in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect Immun* **69**: 538–542.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., and Rahme, L.G. (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1339–1344.
- Diggle, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L., *et al.* (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* **14**: 87–96.
- Ding, Y., Onodera, Y., Lee, J.C., and Hooper, D.C. (2008) NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *J Bacteriol* **190**: 7123–7129.
- Dubern, J.F., and Diggle, S.P. (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* **4**: 882–888.
- Epp, S.F., Kohler, T., Plesiat, P., Michea-Hamzehpour, M., Frey, J., and Pechere, J.C. (2001) C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1780–1787.
- Farrow, J.M., 3rd, and Pesci, E.C. (2007) Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol* **189**: 3425–3433.
- Fletcher, M.P., Diggle, S.P., Camara, M., and Williams, P. (2007) Biosensor-based assays for PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules. *Nat Protoc* **2**: 1254–1262.
- Fukuoka, T., Ohya, S., Narita, T., Katsuta, M., Iijima, M., Masuda, N., *et al.* (1993) Activity of the carbapenem panipenem and role of the OprD (D2) protein in its diffusion through the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 322–327.
- Gallagher, L.A., McKnight, S.L., Kuznetsova, M.S., Pesci, E.C., and Manoil, C. (2002) Functions required for extra-cellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**: 6472–6480.
- Grkovic, S., Brown, M.H., and Skurray, R.A. (2002) Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 671–701.
- Guo, B., Wang, Y., Shi, F., Barton, Y.-W., Plummer, P., Reynolds, D.L., *et al.* (2008) CmeR functions as a pleiotropic regulator and is required for optimal colonization of *Campylobacter jejuni* in vivo. *J Bacteriol* **190**: 1879–1890.
- Hauser, A.R. (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **7**: 654–665.
- Hocquet, D., Bertrand, X., Kohler, T., Talon, D., and Plesiat, P. (2003) Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1887–1894.
- Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N., and Wretling, B. (2000) Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 710–712.
- Jin, Y., Yang, H., Qiao, M., and Jin, S. (2011) MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**: 399–410.
- Knoten, C.A., Hudson, L.L., Coleman, J.P., Farrow, J.M., 3rd, and Pesci, E.C. (2011) KynR, a Lrp/AsnC-type transcriptional regulator, directly controls the kynurenine pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**: 6567–6575.
- Kohler, T., Michea-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., and Pechere, J.C. (1997) Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **23**: 345–354.
- Kohler, T., Epp, S.F., Curty, L.K., and Pechere, J.C. (1999) Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6300–6305.
- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechere, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**: 5990–5996.
- Kohler, T., van Delden, C., Curty, L.K., Hamzehpour, M.M., and Pechere, J.C. (2001) Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 5213–5222.
- Kurnasov, O., Jablonski, L., Polanuyer, B., Dorrestein, P., Begley, T., and Osterman, A. (2003) Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formidase. *FEMS Microbiol Lett* **227**: 219–227.
- Lamarche, M.G., and Deziel, E. (2011) MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS ONE* **6**: e24310.
- Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R., and Rahme, L.G. (2009) Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* **155**: 2845–2855.
- Linares, J.F., Lopez, J.A., Camafeita, E., Albar, J.P., Rojo, F., and Martinez, J.L. (2005) Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 1384–1391.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence



- elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**: 47–56.
- Martinez, J.L., Sanchez, M.B., Martinez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., and Alvarez-Ortega, C. (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 430–449.
- Martinez, J.L., Baquero, F., and Andersson, D.I. (2011) Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr Opin Pharmacol* **11**: 439–445.
- Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., and Nakae, T. (2000) Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 107–112.
- Masuda, N., and Ohya, S. (1992) Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1847–1851.
- Masuda, N., Sakagawa, E., and Ohya, S. (1995) Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 645–649.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., et al. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**: 1526–1530.
- Navas, A., Cobas, G., Talavera, M., Ayala, J.A., Lopez, J.A., and Martinez, J.L. (2007) Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13728–13731.
- Navon-Venezia, S., Ben-Ami, R., and Carmeli, Y. (2005) Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis* **18**: 306–313.
- Palmer, K.L., Aye, L.M., and Whiteley, M. (2007) Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *J Bacteriol* **189**: 8079–8087.
- Piddock, L.J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 629–636.
- Poole, K. (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* **39**: 162–176.
- Ramsey, M.M., and Whiteley, M. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. *Mol Microbiol* **53**: 1075–1087.
- Ruiz-Diez, B., Sanchez, P., Baquero, F., Martinez, J.L., and Navas, A. (2003) Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans*-*Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis model. *J Theor Biol* **225**: 469–476.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual 3rd. Edition*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, P., Linares, J.F., Ruiz-Diez, B., Campanario, E., Navas, A., Baquero, F., and Martinez, J.L. (2002) Fitness of *in vitro* selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* **50**: 657–664.
- Sander, P., Springer, B., Prammananan, T., Sturmfels, A., Kappler, M., Pletschette, M., and Bottger, E.C. (2002) Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1204–1211.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., and Greenberg, E.P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**: 2066–2079.
- Shcherbakov, D., Akbergenov, R., Matt, T., Sander, P., Andersson, D.I., and Bottger, E.C. (2010) Directed mutagenesis of *Mycobacterium smegmatis* 16S rRNA to reconstruct the *in-vivo* evolution of aminoglycoside resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **77**: 830–840.
- Stickland, H.G., Davenport, P.W., Lilley, K.S., Griffin, J.L., and Welch, M. (2010) Mutation of *nfxB* causes global changes in the physiology and metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Proteome Res* **9**: 2957–2967.
- Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999a) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 715–720.
- Tan, M.W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1999b) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2408–2413.
- Tian, Z.X., Fargier, E., Mac Aogain, M., Adams, C., Wang, Y.P., and O'Gara, F. (2009a) Transcriptome profiling defines a novel regulon modulated by the LysR-type transcriptional regulator MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* **37**: 7546–7559.
- Tian, Z.X., Mac Aogain, M., O'Connor, H.F., Fargier, E., Mooij, M.J., Adams, C., et al. (2009b) MexT modulates virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* independent of the MexEF-OprN efflux pump. *Microb Pathog* **47**: 237–241.
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., and Iglewski, B.H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**: 2080–2095.
- Warner, D.M., Shafer, W.M., and Jerse, A.E. (2008) Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and *in vivo* fitness. *Mol Microbiol* **70**: 462–478.
- Williams, P., and Camara, M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**: 182–191.
- Wolter, D.J., Black, J.A., Lister, P.D., and Hanson, N.D. (2009) Multiple genotypic changes in hypersusceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients do not always correlate with the phenotype. *J Antimicrob Chemother* **64**: 294–300.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Genes differentially regulated in strains PT149 and PT637 in logarithmic and in stationary phase.

**Table S2.** Expression of RND efflux pumps in the strain PT149 in comparison with PT5.

**Table S3.** Genes differentially regulated in strain PT149 that also belong to the quorum-sensing regulon<sup>a</sup>.

**Table S4.** Oligonucleotides used in this work.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## Genetic Determinants Involved in the Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to $\beta$ -Lactam Antibiotics<sup>∇</sup>

Carolina Alvarez-Ortega,<sup>1†</sup> Irith Wiegand,<sup>2‡</sup> Jorge Olivares,<sup>1</sup>  
Robert E. W. Hancock,<sup>2</sup> and José Luis Martínez<sup>1\*</sup>

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, Madrid, and CIBERESP, Madrid, Spain,<sup>1</sup> and Centre for Microbial Diseases and Immunity Research, Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z4<sup>2</sup>

Received 22 February 2010/Returned for modification 14 May 2010/Accepted 23 July 2010

**The resistome of *P. aeruginosa* for three  $\beta$ -lactam antibiotics, namely, ceftazidime, imipenem, and meropenem, was deciphered by screening a comprehensive PA14 mutant library for mutants with increased or reduced susceptibility to these antimicrobials. Confirmation of the phenotypes of all selected mutants was performed by Etest. Of the total of 78 confirmed mutants, 41 demonstrated a reduced susceptibility phenotype and 37 a supersusceptibility (i.e., altered intrinsic resistance) phenotype, with 6 mutants demonstrating a mixed phenotype, depending on the antibiotic. Only three mutants demonstrated reduced (PA0908) or increased (*glnK* and *ftsK*) susceptibility to all three antibiotics. Overall, the mutant profiles of susceptibility suggested distinct mechanisms of action and resistance for the three antibiotics despite their similar structures. More detailed analysis indicated important roles for novel and known  $\beta$ -lactamase regulatory genes, for genes with likely involvement in barrier function, and for a range of regulators of alginate biosynthesis.**

*Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen and a leading cause of nosocomial infections (32, 41) and is the major cause of morbidity and mortality among individuals affected by cystic fibrosis (CF) (33). Infections caused by this opportunistic pathogen are difficult to eradicate due to its high intrinsic resistance to different classes of antibiotics. Treatment of patients is further complicated by the emergence of multidrug resistance arising principally from mutations, but also through acquisition of plasmids with antibiotic resistance determinants (32, 41).

$\beta$ -Lactam antibiotics are among the main antibiotics currently used in anti-pseudomonal therapy (18, 56). The killing mechanism of  $\beta$ -lactams is initiated by binding to cell wall transpeptidases (penicillin-binding proteins [PBPs]), thus blocking an important step in peptidoglycan biosynthesis (59). This family of antibiotics includes penicillins, cephalosporins, monobactams, and carbapenems. Resistance to  $\beta$ -lactams commonly results from drug inactivation by  $\beta$ -lactamases, drug extrusion through efflux pumps, changes in outer membrane permeability, and modification of PBPs (46). However, recent publications have demonstrated that a myriad of genetic determinants modulate susceptibility to antibiotics, aside from those responsible for typical antibiotic resistance mechanisms, like the ones described above (8, 16, 19, 52), especially when one considers mutations causing modest changes in the MIC (e.g., 2-fold). Furthermore,  $\beta$ -lactam antibiotics are known to

affect global gene expression, suggesting that the response to these drugs entails many different genes (1, 6).

To identify novel genetic determinants involved in susceptibility to  $\beta$ -lactams, we screened a comprehensive *P. aeruginosa* mutant library (31) for changes in the MICs of imipenem and meropenem (carbapenems) and ceftazidime (a cephalosporin). Our findings demonstrated that mutations in a broad array of genes belonging to different functional families can modulate the susceptibility of *P. aeruginosa* to these antibiotics. This study contributes to our understanding of how pathogens respond and become resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics, revealing certain mutations that, because they cause modest changes in the MIC, may be missed in examination of clinical strains but likely contribute to the stepwise development of resistance in the clinic.

### MATERIALS AND METHODS

**Screening for altered susceptibility to imipenem, ceftazidime, and meropenem.** A comprehensive *P. aeruginosa* PA14 mutant library (31) was screened for genes involved in intrinsic resistance (reduced MIC upon mutation) or reduced susceptibility (increased MIC upon mutation) to three different  $\beta$ -lactam antibiotics. A total of 5,850 mutants corresponding to 4,596 predicted PA14 genes were screened using the agar dilution method as previously described (8, 16, 52). Briefly, overnight cultures grown in 96-well plates in LB medium at 37°C were diluted and used to inoculate Mueller-Hinton agar plates containing the antibiotic of choice. The MIC for the PA14 wild-type strain under these conditions was 1  $\mu$ g/ml for imipenem and ceftazidime and 0.25  $\mu$ g/ml for meropenem. Imipenem and ceftazidime were used at 2-fold increasing concentrations ranging from 0.5 to 16  $\mu$ g/ml. Meropenem was used at 0.5 and 1  $\mu$ g/ml. The plates were incubated at 37°C for at least 18 h before the results were read. Mutants exhibiting at least a 2-fold increase or decrease in MIC with respect to the wild type were considered less susceptible or more susceptible to a particular antibiotic and thus revealed mutational and intrinsic resistance, respectively. The screening was repeated two more times with those mutants that showed a change in susceptibility to any of the three antibiotics used.

**Determination of antibiotic susceptibility.** Imipenem, ceftazidime, and meropenem Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) were utilized, according to the manufacturer's recommendations, to verify the results obtained in the screening. Cultures were grown overnight in LB at 37°C and diluted in sterile 0.85% NaCl

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Cantoblanco, Madrid, Spain, Phone: 34 91 5854542. Fax: 34 92 5854506. E-mail: jlmtnz@cnb.csic.es.

‡ Present address: AiCuris GmbH and Co. KG, Friedrich-Ebert-Str. 475, 42117 Wuppertal, Germany.

† C.A.-O. and I.W. contributed equally to this work.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 2 August 2010.

solution to yield an inoculum of approximately  $1 \times 10^7$  CFU/ml. Mueller-Hinton agar plates were inoculated with 100  $\mu$ l of this dilution, strips were placed on the surface (one strip per plate), and the plate was then incubated at 37°C for 18 h. Each set of determinations included a plate containing the wild-type strain *P. aeruginosa* PA14 as a control for antibiotic susceptibility, in such a way that the MICs for PA14 were repeated 124 times for ceftazidime, with a mean of 0.78 and a modal value of 0.75; 113 times for imipenem, with a mean of 0.44 and a modal value of 0.5; and 192 times for meropenem, with a mean of 0.13 and a modal value of 0.125. Given the consistency of these results, the MICs were considered the modal values of all determinations. Ceftazidime MIC values were also determined using the broth microdilution method according to CLSI guidelines (62). To detect subtle changes in susceptibility, a narrower, linear range of concentrations of ceftazidime were tested, which included 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 16  $\mu$ g/ml, for the mutants presenting either changes in ceftazidime susceptibility or increased levels of  $\beta$ -lactamase activity.

**Determination of  $\beta$ -lactamase activity.** Cells were grown to an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 1.0, harvested by centrifugation, and resuspended in 0.1 M  $KH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$  (pH 7.0) buffer. Crude protein extracts were prepared by two freeze-thaw cycles, followed by sonication on ice. The  $\beta$ -lactamase activity was quantified spectrophotometrically by measuring the change in absorbance at 485 nm using the chromogenic  $\beta$ -lactamase substrate nitrocefin at 50  $\mu$ M (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) and 0.1 M  $KH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$  (pH 7.0) as the test buffer. The protein content of each extract was determined using the bicinchoninic acid (BCA) method with bovine serum albumin as a standard. *P. aeruginosa* mutants from the PA14 library (31) and the mini-Tn5-*luxCDABE* PAO1 mutant library (30) were utilized to confirm the antibiotic susceptibility phenotypes of mutant alleles.

**Complementation of *algU*, *mucD*, *dacB*, and *mpl* mutants.** The broad-host-range cloning vector pBBR1MCS-3 (27) was utilized to clone *algU* and *mucD*. To complement the *algU* mutant, the *algU-mucABCD* region was amplified by PCR, including 111 bp upstream of the *algU* translational start site to permit transcription from the native promoter (12). For complementation of the *mucD* mutant, the *mucD* gene sequence, including 54 bp upstream containing the translational start site, was amplified. Both sequences were digested with *ApaI* and *SacI* and cloned into pBBR1MCS-3. In the case of *mucD*, transcription was enabled by the *lac* promoter in pBBR1MCS-3. The broad-host-range cloning vector pUCP27 (53) was used to clone the *dacB* and *mpl* genes, including 483 and 313 bp, respectively, upstream of the translational start sites.

**Data analysis.** Venn diagrams were generated using the Venny tool from BioinfoGP (44). Hierarchical clustering (14) was performed using freely available software (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Overview of the screening results.** Screening of existing individual mutants in the *P. aeruginosa* PA14 mutant library using the agar dilution method allowed us to identify mutants exhibiting changes in MIC as small as 2-fold for each of the antibiotics imipenem, ceftazidime, and meropenem. To ensure the reliability of our results, the screening was performed independently in our two laboratories, and MICs were determined at least three times. Furthermore, the results were verified by an agar diffusion method using the Etest (62), and mutants with changes in MIC that could not be reproduced were discarded. These safeguards, together with the finding of mutations in an operon relationship (e.g., PA5001 to PA5005) and the isolation of mutations in genes for which roles in susceptibility to  $\beta$ -lactams have been described (see below), added credence to our screening. Some of the mutations might reduce the bacterial growth rate. This might be relevant for determining their antibiotic susceptibility for two reasons. Slow-growing bacteria are less susceptible to bactericidal antibiotics (29). On the other hand, the inoculum size is relevant for the activity of  $\beta$ -lactams (50, 51). To address whether these issues might bias our results, the growth rates of all mutants were measured. Only 10 of the mutants presented a relevant increase in their duplication times (>50%) in com-

parison with the wild-type strain. Two of these mutants were excluded from further studies after Etest assays. Of the remaining eight mutants, only one (PA2797) was less susceptible than the wild type to one antibiotic (ceftazidime; MIC, 3  $\mu$ g/ml), indicating that the observed phenotypes are not just the consequence of a change in growth rate. For all selected mutants, the MICs to the three  $\beta$ -lactams were further verified by Etest. To avoid differences in inoculum sizes that might influence the assays for those mutants with changes in their growth rates, equal numbers of cells were seeded on each plate (see Materials and Methods). In a few cases, the Etest allowed the detection of changes in antibiotic susceptibility that were not evident in the initial screening. Since the Etest is a more robust method to detect small differences in MICs than doubling-dilution methodologies and the results were verified in triplicate by Etest, those phenotypes were included in the results (Tables 1 and 2).

Since we wanted to analyze even small changes in susceptibility, we considered those mutants presenting reduced susceptibility to the tested antibiotics, even if the MIC did not reach the breakpoint required for the clinical definition of resistance. This so-called low-level resistance (4) is the hallmark for eventual acquisition of clinically relevant resistance to antibiotics, so that deciphering the mechanisms of low-level resistance is necessary to understand in depth antibiotic resistance in bacterial pathogens (4, 35, 36). We found that mutations in 78 different *P. aeruginosa* PA14 loci resulted in changes in MICs, with respect to the wild-type strain, with at least one out of the three  $\beta$ -lactam antibiotics we utilized in our screening (Tables 1 and 2). Of these, 41 demonstrated a reduced susceptibility phenotype (Table 1) and 37 a supersusceptibility phenotype (Table 2), with 6 mutants demonstrating a mixed phenotype, depending on the antibiotic. To identify common, as well as unique, genetic determinants that may contribute to intrinsic antibiotic resistance or sensitivity, a Boolean analysis of the results was performed and displayed using Venn diagrams (Fig. 1).

In agreement with studies examining the resistomes of other antibiotics (8, 16, 19, 52), the majority of the mutants showed a modest (around 2-fold) change in MIC. Small changes in MIC values are often not taken into consideration. However, it has been demonstrated that the accumulation of mutations with modest individual contributions to the MIC can lead to significant antibiotic resistance (5, 15, 19, 42). Furthermore, these types of mutations are likely the basis for MIC creep, which can be defined as the constant rise over time in the basal intrinsic resistance of an average isolate of a given bacterial species (55).

Overall, our results show that a wide variety of gene products modulate the susceptibility of *P. aeruginosa* to  $\beta$ -lactams. Together with similar results recently published for other antibiotics (8, 16, 19, 52), this supports the concept that intrinsic resistance to antibiotics is the result of the concerted actions of several elements (36). While it is already well established that outer membrane protein mutations, efflux, and  $\beta$ -lactamase collaborate to determine susceptibility or resistance to  $\beta$ -lactams, these studies indicate a substantial array of new elements that also modulate susceptibility.

In spite of their different spectra of activity and their differential sensitivities to various  $\beta$ -lactamases (46), imipenem,



TABLE 1. Mutations that decrease the susceptibility of *P. aeruginosa* to  $\beta$ -lactams

PAO1 ortholog or PA14 no. <sup>a</sup>	Gene name and/or description	MIC ( $\mu$ g/ml) <sup>b,c</sup>		
		CAZ	IPM	MEM
PA14	Wild-type strain	0.75	0.5	0.125
PA0479	Putative transcriptional regulator, LysR family	<b>2</b>	<b>1</b>	0.047 <sup>e</sup>
PA0667	Putative metallopeptidase	<b>2<sup>d</sup></b>	0.5	0.19
PA0807	<i>ampDh3</i> ; hypothetical protein	0.75	<b>1</b>	<b>0.25<sup>d</sup></b>
PA0908	Hypothetical protein	<b>2</b>	<b>1.5</b>	<b>0.25<sup>d</sup></b>
PA0958	<i>oprD</i> ; basic amino acids and peptides and imipenem outer membrane porin OprD	0.75	<b>2</b>	<b>1</b>
PA1348	Conserved hypothetical protein	<b>1.5<sup>d</sup></b>	0.5	<b>0.5</b>
PA14_15600	Conserved hypothetical protein	<b>1.5</b>	0.5	0.125
PA14_23420	Putative zinc-binding dehydrogenase	<b>2</b>	0.38	0.125
PA14_23430	Putative heparinase	<b>2</b>	0.38	0.125
PA14_43090	Hypothetical protein	<b>2</b>	0.38	0.125
PA14_06490	Hypothetical protein	<b>2</b>	0.38	0.125
PA1553	Putative cytochrome <i>c</i> oxidase, cbb3 type, subunit II	0.75	<b>1</b>	0.125
PA2023	<i>galU</i> ; UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<b>3<sup>d</sup></b>	<b>0.094</b>	<b>0.38</b>
PA2487	Hypothetical protein	<b>2<sup>d</sup></b>	0.5	0.125
PA2621	<i>clpS</i> ; putative cytoplasmic protease	<b>4</b>	0.38	0.19
PA2797	Putative anti-anti-sigma factor	<b>3</b>	0.5	0.094
PA3141	<i>wbpM</i> ; nucleotide sugar epimerase/dehydratase WbpM	<b>2</b>	0.5	0.125
PA3145	<i>wbpL</i> ; putative glycosyltransferase L	<b>2</b>	0.38	0.094
PA3247	Putative aspartyl aminopeptidase	<b>2</b>	0.38	0.125
PA3259	Conserved hypothetical protein	<b>1.5</b>	0.5	0.125
PA3520	Putative periplasmic metal-binding protein	<b>1.5</b>	0.5	<b>0.38<sup>d</sup></b>
PA3589	Acetyl-coenzyme A (CoA) acetyltransferase (thiolase)	<b>2</b>	0.5	0.125
PA3620	<i>mutS</i> ; DNA mismatch repair protein MutS	<b>2</b>	0.38	0.125
PA3667	Putative cysteine sulfinate desulfinate	<b>3</b>	<b>0.75</b>	0.125
PA3704	<i>wspE</i> ; putative chemotaxis protein	<b>2</b>	0.5	<b>0.25<sup>d</sup></b>
PA3721	<i>nalC</i> ; putative transcriptional regulator	<b>1.5<sup>d</sup></b>	0.5	<b>0.38<sup>d</sup></b>
PA4109	<i>ampR</i> ; transcriptional regulator AmpR	<b>4</b>	<b>0.25</b>	0.125
PA4402	<i>argJ</i> ; <i>N</i> -acetylglutamate synthase	<b>3</b>	0.38	0.19
PA4459	Conserved hypothetical protein	<b>1.5</b>	<b>0.25</b>	0.125
PA4527	<i>pilC</i> ; type 4 fimbrial biogenesis protein	<b>2</b>	0.38	0.125
PA4550	<i>fimU</i> ; type 4 fimbrial biogenesis protein	<b>2<sup>d</sup></b>	0.5	0.125
PA4748	<i>tpiA</i> ; triosephosphate isomerase	<b>1.5<sup>d</sup></b>	0.38	<b>0.25<sup>d</sup></b>
PA4946	<i>mutL</i> ; DNA mismatch repair protein MutL	<b>1.5</b>	0.38	0.094
PA5000	<i>wapR</i> ; putative glycosyl transferase	<b>4</b>	0.5	<b>0.38<sup>d</sup></b>
PA5001	Conserved hypothetical protein	<b>3</b>	0.38	<b>0.38<sup>d</sup></b>
PA5002	Hypothetical protein	<b>1.5<sup>d</sup></b>	0.38	0.094
PA5003	Conserved hypothetical protein	<b>3</b>	0.5	<b>0.25<sup>d</sup></b>
PA5005	Putative carbamoyltransferase	<b>3</b>	0.25	0.125
PA5038	<i>aroB</i> ; 3-dehydroquinate synthase	<b>3</b>	0.38	<b>0.25</b>
PA5192	<i>pckA</i> ; phosphoenolpyruvate carboxykinase	0.5	0.38	<b>0.25</b>
PA5443	<i>uvrD</i> ; DNA helicase II	<b>1.5</b>	0.5	0.094

<sup>a</sup> Mutant in PAO1 ortholog. Some mutations were in PA14 genes that have no PAO1 ortholog.<sup>b</sup> MIC determined by Etest. Changes in MICs of  $\geq 2$ -fold are in boldface.<sup>c</sup> CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; MEM, meropenem.<sup>d</sup> A change in MIC was observed only with the Etest.<sup>e</sup> The screening revealed a decrease in susceptibility rather than an increase.

ceftazidime, and meropenem all affect cell wall synthesis by interacting with specific penicillin-binding proteins and murein hydrolases (59); therefore, we expected to identify a core set of genetic determinants involved in susceptibility to this family of antibiotics. However, the Boolean analysis of our results and hierarchical clustering of the phenotypes (Fig. 1) indicated that the overlap among the different phenotypes is minimal. Indeed, we found only one mutant with reduced susceptibility to all three antibiotics (PA0908; MICs, 2, 1.5, and 0.25  $\mu$ g/ml for ceftazidime, imipenem, and meropenem, respectively) and two mutants with increased sensitivity to all three antibiotics (*glnK*, with MICs of 0.5, 0.25, and 0.047  $\mu$ g/ml for ceftazidime, imipenem, and meropenem, respectively, and *ftsK*, with MICs of 0.25, 0.19, and 0.064  $\mu$ g/ml for ceftazidime, imipenem, and meropenem, respectively) (Tables 1 and 2). A further 14 mu-

tants showed reduced susceptibility to two antibiotics, and 12 showed increased susceptibility to two antibiotics (Fig. 1). Despite the structural similarities between meropenem and imipenem, there was a larger number of mutants showing decreased susceptibility to ceftazidime and meropenem than mutants with reduced susceptibility to both imipenem and meropenem (Table 1).

**Mutants with reduced susceptibility and altered uptake or efflux.** In our screen, there was a larger number of mutants resulting in a decrease in susceptibility to ceftazidime than to the other two antibiotics (Table 1). This suggests that *P. aeruginosa* might be more likely to develop mutation-driven resistance to ceftazidime than to imipenem or meropenem (34). This is important from a clinical perspective, since all three antibiotics are used in antipseudomonal therapy (18). For

TABLE 2. Mutations that increase the susceptibility of *P. aeruginosa* to  $\beta$ -lactams

PAO1 ortholog or PA14 no. <sup>a</sup>	Gene name and/or description	MIC ( $\mu$ g/ml) <sup>b,c</sup>		
		CAZ	IPM	MEM
PA14	Wild-type strain	0.75	0.5	0.125
PA0011	Putative 2-OH-lauroyltransferase	<b>0.38<sup>d</sup></b>	0.38	0.125
PA0401	Noncatalytic dihydroorotase-like protein	<b>0.38</b>	0.38	<b>0.064</b>
PA0402	<i>pyrB</i> ; aspartate carbamoyltransferase	<b>0.38</b>	0.38	0.125
PA0420	<i>bioA</i> ; adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	<b>0.5</b>	<b>0.125</b>	0.094
PA0427	<i>oprM</i> ; major intrinsic multiple antibiotic resistance efflux outer membrane protein	<b>0.38</b>	0.38	<b>0.023</b>
PA0503	Putative biotin synthesis protein BioC	<b>0.5<sup>d</sup></b>	<b>0.19</b>	0.125
PA0764	<i>mucB</i> ; negative regulator for alginate biosynthesis	0.75	<b>0.25</b>	0.125
PA0766	<i>mucD</i> ; serine protease MucD precursor	<b>0.38</b>	<b>0.25</b>	0.125
PA0770	<i>rnc</i> ; RNase III	<b>0.5</b>	<b>0.75<sup>d</sup></b>	<b>0.047</b>
PA1011	Putative lipoprotein	<b>0.5</b>	0.5	0.19
PA1195	Putative dimethylarginine dimethylaminohydrolase	<b>0.5</b>	0.38	0.125
PA14_07490/07510	Intergenic region	<b>0.5</b>	0.5	0.094
PA14_59780	<i>rcsC</i> ; two- component system kinase sensor	<b>0.38</b>	0.5	0.125
PA1483	<i>cycH</i> ; cytochrome <i>c</i> -type biogenesis protein	<b>0.5</b>	0.5	0.125
PA2128	<i>cupA1</i> ; fimbrial subunit CupA1	<b>0.5</b>	0.38	0.125
PA2615	<i>ftsK</i> ; cell division/stress response protein	<b>0.25</b>	<b>0.19</b>	<b>0.064</b>
PA2963	Putative aminodeoxychorismate lyase	0.75	<b>0.25</b>	0.125
PA2970	<i>rpmF</i> ; 50S ribosomal protein L32	<b>0.5</b>	0.5	0.125
PA3050	<i>pyrD</i> ; dihydroorotate dehydrogenase	<b>0.5</b>	<b>0.25</b>	0.094
PA3262	<i>fkfB</i> ; put. peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> -isomerase, FkbP type	0.75	<b>0.25</b>	0.125
PA3433	Putative transcriptional regulator, LysR family	<b>0.5</b>	<b>0.19</b>	0.125
PA3649	Putative membrane-associated zinc metalloprotease	<b>0.5</b>	<b>0.25</b>	0.125
PA3800	Conserved hypothetical protein	<b>0.25</b>	0.38	0.125
PA3818	<i>suhB</i> ; extragenic suppressor protein SuhB	<b>0.5</b>	0.38	<b>0.064</b>
PA3978	Hypothetical protein	0.75	<b>0.094</b>	0.125
PA4005	Conserved hypothetical protein	0.75	<b>0.064</b>	0.094
PA4007	<i>proA</i> ; probable $\gamma$ -glutamyl phosphate reductase	0.75	<b>0.19</b>	0.125
PA4069	Putative dTDP-4-rhamnose reductase-related protein	0.75	<b>0.25</b>	<b>0.064</b>
PA4088	Putative aminotransferase	<b>0.25</b>	0.38	0.125
PA4269	<i>rpoC</i> ; DNA-directed RNA polymerase $\beta$ chain	<b>0.5</b>	0.5	0.094
PA4393	Putative permease	0.75	<b>0.25</b>	0.19
PA4745	<i>nusA</i> ; N utilization substance protein A	0.75	<b>0.25</b>	0.125
PA4753	Putative RNA-binding protein	<b>0.25</b>	0.5	<b>0.064</b>
PA5130	Putative rhodanese-like domain protein	0.75	<b>0.19</b>	0.125
PA5174	Putative $\beta$ -ketoacyl synthase	1	<b>0.125</b>	0.125
PA5288	<i>glnK</i> ; nitrogen regulatory protein PII-2	<b>0.5<sup>d</sup></b>	<b>0.25</b>	<b>0.047</b>
PA5366	<i>pstB</i> ; phosphate ABC transporter, ATP binding	0.75	<b>0.25<sup>d</sup></b>	0.125

<sup>a</sup> Mutant in PAO1 ortholog. Some mutations were in PA14 genes that have no PAO1 ortholog.

<sup>b</sup> MIC determined by Etest. Changes in MICs of  $\geq 2$ -fold are in boldface.

<sup>c</sup> CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

<sup>d</sup> A change in MIC was observed only with the Etest.

many of the mutants that exhibited a decrease in susceptibility to ceftazidime alone, the mutations were in genes involved in cell wall and lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis, as well as in genes encoding membrane proteins (*wapR* and PA5001 to PA5005) (Table 1), suggesting a decrease in antibiotic penetration as the basis for the observed increase in the MIC.

As anticipated, well-defined mutants influencing antibiotic uptake were also isolated, a result that further attests to the reliability of our screening. Nonhydrolytic resistance to third-generation cephalosporins like ceftazidime often results from antibiotic extrusion through efflux pumps, such as MexAB-OprM (39, 46). Accordingly, we found that a mutation in the gene coding for the NalC negative regulator (9) of the major intrinsic multidrug efflux pump, MexAB-OprM, made *P. aeruginosa* less susceptible (Table 1) while an *oprM* mutant was more susceptible to ceftazidime (Table 2) (MICs, 1.5 and 0.38  $\mu$ g/ml, respectively). Imipenem and meropenem differ in a number of structural features and in their antipseudomonal activities, with meropenem being the more efficient of the two

carbapenems (10, 18). Nevertheless, the OprD outer membrane porin serves as the major route of entry for both imipenem and meropenem, and resistance in clinical isolates is usually associated with lower expression or loss of this porin (45). As expected, an *oprD* mutant identified through our screening exhibited a decrease in susceptibility to both carbapenems (the MIC of imipenem is 2  $\mu$ g/ml, and that of meropenem is 1  $\mu$ g/ml) (Table 1).

**Mutants with reduced susceptibility and altered LPS compositions.** A mutation in PA5000, which encodes the WapR  $\alpha$ -1,3-rhamnosyltransferase involved in the biosynthesis of the LPS core oligosaccharide (47), made *P. aeruginosa* less susceptible to ceftazidime and meropenem (the MIC of ceftazidime is 4  $\mu$ g/ml, and that of meropenem is 0.38  $\mu$ g/ml) (Table 1). It was previously reported that a *wapR* mutant lacked  $\alpha$ -1,3-linked L-rhamnose and therefore produced LPS with no O antigen (47). Interestingly, genes PA5001, PA5002, PA5003, and PA5005, which are part of a large LPS core oligosaccharide gene cluster, were also detected in the screen for reduced

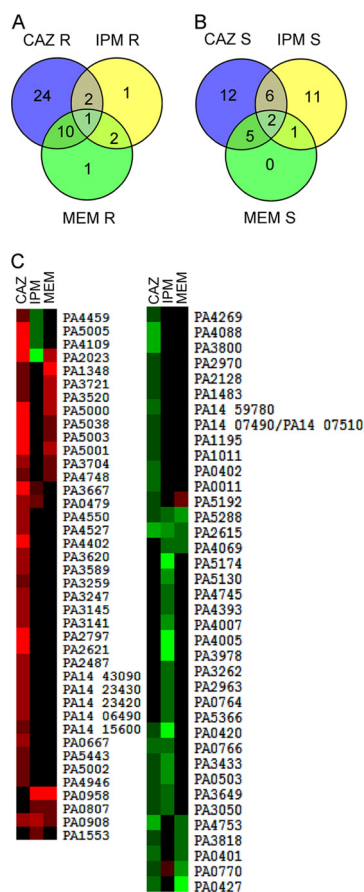


FIG. 1. Global analysis of the mutants that exhibited a decrease or an increase in susceptibility to at least one  $\beta$ -lactam. Abbreviations for antibiotics are as follows: IPM, imipenem; CAZ, ceftazidime; and MEM, meropenem. (A and B) Venn diagrams resulting from a Boolean analysis of the phenotypes of the mutants. (A) Venn diagram created with mutants showing a decrease in susceptibility to at least one  $\beta$ -lactam. R stands for “resistant” mutants. (B) Venn diagram created with mutants showing an increase in susceptibility to at least one  $\beta$ -lactam. S stands for “sensitive” mutants. (C) Analysis of the association of the phenotypes of the different mutants. The analysis was performed by hierarchical clustering of the MIC fold changes shown in Tables 1 and 2. The green bars stand for mutants with an increase in susceptibility; the red bars stand for mutants with a decrease in susceptibility. The heat map was constructed by using Cluster and TreeView software (14).

susceptibility to ceftazidime, and some mutants were cross resistant to meropenem (25) (Table 1). The increase in the MIC (3  $\mu$ g/ml with ceftazidime and 0.38  $\mu$ g/ml with meropenem), due to an insertion in PA5001, a putative glycosyltransferase gene, observed with the Etest was also confirmed in broth dilution assays (a 3-fold increase in the ceftazidime MIC versus the PA14 wild type). The respective PAO1 mutant from the mini-Tn5-*luxCDABE* mutant library (27) also showed a 2-fold increase in MIC versus the PAO1 wild type. Other genes involved in LPS biosynthesis that led to increased ceftazidime MIC values were *wpmM* (PA3141; 2  $\mu$ g/ml), *wbpL* (PA3145; 2  $\mu$ g/ml), *wspE* (PA3704; 2  $\mu$ g/ml), and *galU* (PA2023; 3  $\mu$ g/ml) (Table 1). Alterations in LPS composition might affect outer membrane barrier properties and hence antibiotic penetration, thus reducing their efficacy (17, 21).

**Mutations in genes that affect  $\beta$ -lactamase production.** We were particularly interested in identifying novel genes that are involved in the regulation of the *Pseudomonas* chromosomally encoded, inducible AmpC  $\beta$ -lactamase. Thus, mutants that showed an increased ceftazidime MIC on agar and in microdilution MIC assays, with the exception of mutants with a previously described mutator phenotype (63), were tested for  $\beta$ -lactamase overexpression. Table 3 shows the mutants with 2-fold or higher  $\beta$ -lactamase activity compared to the wild-type strain. Four of the PA14 high-level  $\beta$ -lactamase-producing mutants (PA0090, PA2023, PA2989, and PA3589) were found only in the PA14 background but could not be confirmed with mutants in the PAO1 background (data not shown).  $\beta$ -Lactamase overproduction in the respective PA14 mutants might be due to an accumulation of secondary mutations in these strains, and consistent with this interpretation, the PA2023 (*galU*) and PA3589 mutants had elevated mutation frequencies (data not shown). Alternatively, this may result from differences in the insertion point of the transposon or as a consequence of the different genetic backgrounds of the PAO1 and PA14 strains. The fact that intrinsic resistance has some degree of strain specificity is supported by other studies (11, 13) and by the findings from our screen of elements that contributed to the  $\beta$ -lactam resistome of *P. aeruginosa* PA14 but were absent in the genome of strain PAO1 (Tables 1 and 2). Four transposon mutants, *ampR*, *ampD*, *dacB*, and *mpl*, were found to lead to  $\beta$ -lactamase overproduction in both *P. aeruginosa* strains.

TABLE 3. *P. aeruginosa* mutants with reduced ceftazidime susceptibility and increased  $\beta$ -lactamase activity

Deletion mutant PA no.	Gene	Gene description	Specific $\beta$ -lactamase activity <sup>a</sup>		Fold increase in $\beta$ -lactamase activity <sup>b</sup>	
			PA14	PAO1	PA14	PAO1
PA14 wild type			4.9		1	
PAO1 wild type				6.9		1
PA3047	<i>dacB</i>	D-Alanyl-D-alanine carboxypeptidase, PBP4	110	274	22	40
PA3047 (pUCP27- <i>dacB</i> <sup>+</sup> )		Complemented <i>dacB</i> mutant	3.8		0.7	
PA4020	<i>mpl</i>	UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase	96	168	19.5	24
PA4020 (pUCP27- <i>mpl</i> <sup>+</sup> )		Complemented <i>mpl</i> mutant	7.3		1.5	
PA4109	<i>ampR</i>	Transcriptional regulator AmpR	257	111	52	16
PA4522	<i>ampD</i>	N-Acetyl-anhydromuranmyl-L-alanine amidase	31	74	6.4	11

<sup>a</sup> Expressed as nmol nitrocefin hydrolyzed/min  $\cdot$  mg protein.

<sup>b</sup> Fold change of the mutant in comparison with its wild-type parental strain.

AmpR has been identified in all bacteria with inducible AmpC  $\beta$ -lactamase expression, including *P. aeruginosa*. Anhydromuropeptides that accumulate on induction with  $\beta$ -lactam antibiotics or during perturbation of the peptidoglycan-recycling pathway (*ampD* mutations) turn AmpR into an activator of transcription (2, 61). It has been shown that both the ceftazidime-resistant PA14 *ampR* and the PAO1 *ampR* mutants produced significantly higher (16 to 52 times) levels of  $\beta$ -lactamase (26) (Table 3). The increased  $\beta$ -lactamase activity of these mutants has been attributed to increased production of the  $\beta$ -lactamases AmpC (40) and PoxB (26). Since production of high levels of PoxB does not change ceftazidime susceptibility (20), we conclude that the increased ceftazidime MIC in the *ampR* mutants (3-fold in PA14) (Table 3) might be explained by increased production of AmpC  $\beta$ -lactamase. Besides reduced susceptibility to ceftazidime, the strain PA14 *ampR* mutant showed an increase in imipenem susceptibility (Table 1). Data from Moya et al. for strain PAO1 are in agreement with this finding (40). Since we found that the PA14 *poxB* mutant had no alteration in susceptibility to either imipenem or meropenem (data not shown), the observed increase in susceptibility to carbapenems might be due to other genes regulated by AmpR, a hypothesis that is supported by the role of AmpR as a global regulator in *P. aeruginosa* (26).

As expected (24), strain PA14 and PAO1 *ampD* mutants overproduced the AmpC  $\beta$ -lactamase (6.4-fold and 11-fold, respectively). *P. aeruginosa* encodes three AmpD homologs in its genome that contribute to AmpC induction, likely by increasing the amounts of the inducing ligand for AmpR (24). In our screen, the *ampDh3* mutant was determined to be less susceptible to imipenem (MIC, 1  $\mu$ g/ml) (Table 1) and meropenem (MIC, 0.25  $\mu$ g/ml) (Table 1) than the wild-type strain, again pointing to the fact that AmpR might be involved in regulating carbapenem susceptibility genes. Although the hydrolysis of imipenem and meropenem by *P. aeruginosa* AmpC is below the limits of detection (48), and it has been stated that AmpC alone does not account for the increased susceptibility to carbapenems observed in a mutant that overproduces the MDR efflux pump *mexCD-oprJ* (64), it has also been shown that this  $\beta$ -lactamase can contribute to intrinsic resistance by its interplay with other mechanisms, such as the permeability of the outer membrane and the activity of the MDR efflux pumps (38, 43). Thus, the possibility that AmpC, in cooperation with other elements, might play a role in the observed reduced susceptibility to carbapenems of this mutant cannot be ruled out.

A recent study showed that deletion of the nonessential penicillin-binding protein PBP4, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase encoded by PA3047 (*dacB*), triggers overexpression of *ampC* (40). In agreement with this report, we found that a *dacB* mutant was less susceptible to ceftazidime, with a MIC of 6  $\mu$ g/ml versus the 2  $\mu$ g/ml of wild-type PA14 (determined by broth microdilution using a linear range of concentrations; see Materials and Methods), and led to 22- to 40-fold-increased  $\beta$ -lactamase activity (i.e., greater than an *ampD* mutant). Furthermore, we found that this change in the levels of  $\beta$ -lactamase activity could be complemented with the cloned *dacB* gene (Table 3). Consistent with this complementation, the MIC of ceftazidime was restored to the levels of the wild-type strain, 2  $\mu$ g/ml, upon complementation. Since it was not

known whether other nonessential PBPs also contributed to AmpC overproduction in *P. aeruginosa*, we determined the  $\beta$ -lactamase activities of the PA14 mutants *pbpG* (PA0869), encoding a D-alanyl-D-alanine endopeptidase, and *dacC* (PA3999), a second D-ala-D-ala-carboxypeptidase. Both mutants showed  $\beta$ -lactamase activities comparable to that of the wild-type strain (data not shown).

Disruption of the gene PA4020 (*mpl*) caused a small increase in the ceftazidime MIC (3  $\mu$ g/ml) in comparison with the wild-type strain (2  $\mu$ g/ml) and an approximately 20-fold increase in  $\beta$ -lactamase activity in both PA14 and PAO1. Susceptibility to ceftazidime and  $\beta$ -lactamase activity were restored to the levels of the wild-type strain by reintroducing the *mpl* gene on a multicopy plasmid. Mpl is a UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase, an enzyme that is active in the peptidoglycan-recycling pathway. In an *Escherichia coli* *mpl* mutant, a 1.7-fold decrease in the level of the UDP-MurNAc-pentapeptide pool was observed compared to the wild type (23). In *Citrobacter freundii*, *in vitro* transcription assays demonstrated that this murein precursor acts as a repressing ligand for AmpR (57). It has been suggested that a similar situation might occur in *P. aeruginosa* (32, 40). However, no experimental evidence had been provided. The substantial overproduction of the AmpC  $\beta$ -lactamase in the *P. aeruginosa* *mpl* and *ampR* mutants, as seen in this study, supports these suggestions (32, 40), indicating that *P. aeruginosa* AmpR might be regulated through the peptidoglycan-recycling pathway, as in the case of *C. freundii* (57).

**Mutants showing increased susceptibility to  $\beta$ -lactams.** One of the two mutants showing an increase in susceptibility to all three antibiotics was the *ftsK* mutant (MICs, 0.25, 0.19, and 0.064  $\mu$ g/ml for ceftazidime, imipenem, and meropenem, respectively) (Table 2). FtsK is a multidomain protein involved in cell division and possibly in the final stages of peptidoglycan biosynthesis (60). The hypersusceptibility phenotype is not exclusive to  $\beta$ -lactams, as a *P. aeruginosa* *ftsK* mutant has been shown to be more susceptible to other families of antibiotics (8, 13). PA0011 encodes a putative 2-OH-lauroyltransferase involved in lipid A biosynthesis and is a homolog of *E. coli* LpxL. Susceptibility to ceftazidime (MIC, 0.38  $\mu$ g/ml) (Table 2), therefore, might be due to an increase in the cell permeability, since an increase in antibiotic susceptibility has also been reported in an *E. coli* *lpxL* mutant (58).

The number of mutants more susceptible to ceftazidime was comparable to the numbers obtained with imipenem (Fig. 1). The former included a mutant in *rscC* (MIC, 0.38  $\mu$ g/ml) (Table 2), which encodes a sensor kinase that forms part of the Rcs phosphorelay found in a number of pathogenic bacteria (22). In *E. coli*, the Rcs pathway responds to damage to the peptidoglycan layer and contributes to intrinsic resistance to  $\beta$ -lactams (19, 28). According to our data, this system might have a similar function in *P. aeruginosa*.

**Mutations in genes involved in alginate production.** *P. aeruginosa* CF isolates often bear mutations leading to overproduction of alginate exopolysaccharide that result in a highly mucoid phenotype that is proposed to contribute to the viscous mucus in the lungs of individuals with CF (33). The expression of genes required for alginate production is under the control of the alternative sigma factor AlgU (49). MucA and MucB negatively regulate AlgU by sequestering it until the appropri-



TABLE 4. Imipenem MICs for *algU*- and *mucD*-complemented strains

Strain	MIC <sup>a</sup> ( $\mu$ g/ml)
Wild type	0.5
Wild type(pBBR1 MCS-3)	0.5
<i>algU</i>	0.38
<i>algU</i> (pBBR1 MCS-3)	0.38
<i>algU</i> (pBBR- <i>algU</i> )	0.5
<i>mucD</i>	0.25
<i>mucD</i> (pBBR1 MCS-3)	0.25
<i>mucD</i> (pBBR- <i>mucD</i> )	0.5

<sup>a</sup> MIC determined by Etest in triplicate. The Mueller-Hinton plates contained tetracycline at 20  $\mu$ g/ml for plasmid maintenance.

ate environmental signals cue alginate biosynthesis (49). In addition, AlgU is negatively regulated by the periplasmic serine proteases MucD and AlgW (7). Predictably, *mucA*, *mucB*, *mucD*, and *algW* mutants overproduce alginate when grown under the appropriate conditions (7, 49). In our screen, mutants in *algU*, *mucB*, *mucD*, and *algW* were found to be more susceptible to imipenem. The phenotypes of *mucB* and *mucD* mutants were confirmed by Etest assays (MIC for both, 0.25  $\mu$ g/ml) (Table 2), whereas *algU* and *algW* mutants presented a consistent reduction in their MIC values that was below the threshold used in our study. As *mucA* and *mucC* mutants are not available in the PA14 mutant library, we did not screen their phenotype. Confirming the involvement of these determinants in the susceptibility to imipenem of *P. aeruginosa*, expression of cloned *algU* (from its native promoter) and *mucD* restored the imipenem MICs for the corresponding mutants to that of the wild type (0.5  $\mu$ g/ml) (Table 4). It is known that cell wall-inhibitory antibiotics induce alginate biosynthesis through a mechanism that requires AlgU (1, 65). The small, yet consistent, increase in susceptibility to imipenem exhibited by the *algU* mutant is in agreement with these studies. The results obtained with the *mucB* and *mucD* mutants suggest that this is a complex signaling mechanism that requires the release of AlgU at the appropriate time upon signal recognition. The constant availability of AlgU might interfere with the ability of cells to respond to cell wall damage through altered expression of genes. Interestingly, mucoid clinical isolates have been shown to be more susceptible to some antibiotics (3), and in agreement with our data, a recent study reported the hypersusceptibility of a *mucB* mutant to a variety of antibiotics (13).

**Conclusions.** Bacteria presenting low-level susceptibility to antibiotics (intrinsic resistance) are a relevant clinical problem. Understanding the mechanisms involved in such resistance, as well as the potential to achieve mutation-driven reduced susceptibility to antibiotics, is a relevant task to fight infections by these microorganisms and to predict the possibility of emergence of resistance (35). This might be particularly relevant for organisms like *P. aeruginosa* that produce chronic infections during which resistance is acquired through mutations (37, 54). Because of this, a number of studies have been recently published on the resistome of *P. aeruginosa* to different families of antibiotics (8, 16, 19, 52). Here, we have presented data on the intrinsic and mutational resistome of this bacterial species to  $\beta$ -lactams. While we found mutants that displayed a decrease or an increase in susceptibility to at least two  $\beta$ -lactams, our

results suggest that each antibiotic used in this study has a distinct effect on *P. aeruginosa* and that many determinants modulate the susceptibility to these antibiotics in this opportunistic pathogen. They include a number of mutants with mutations in genes involved in cell wall and LPS biosynthesis, mutants with mutations in genes coding for transporters or efflux determinants, and mutants with altered expression of chromosomally encoded  $\beta$ -lactamases. Interestingly, some of these mutants were also less susceptible to tobramycin (52), indicating that intrinsic resistance to antibiotics lacks specificity to some degree. This is particularly important for CF patients, since current treatment of advanced lung disease often comprises combination therapy of tobramycin associated with a  $\beta$ -lactam (56), and mutations causing coresistance to both antibiotics might be relevant in this situation. The increase in susceptibility observed with the *muc* mutants is also interesting, given that chronic infections caused by mucoid *P. aeruginosa* are characterized by resistance to antibiotic treatment (33).

Together with previously published studies of other antibiotics (8, 16, 19, 52), our results for the  $\beta$ -lactam resistome indicate that the intrinsic and mutational resistomes of *P. aeruginosa* involve a wide array of elements. The fact that mutations in dozens of genes reduced susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics also indicates that this bacterial species has a high potential to evolve toward resistance.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jesús Blázquez for sharing the pBBR1MCS-3 cloning vector with us.

Research in J.L.M.'s laboratory was supported by BIO2008-00090 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and KBBE-227258 (BIOHYPO) and HEALTH-F3-2010-241476 (PAR) from the European Union. R.E.W.H. was supported by the Canadian Cystic Fibrosis Foundation. C.A.-O. is the recipient of a JAE contract from CSIC. J.O. is the recipient of a fellowship from Programa Beca Chile, CONICYT. R.E.W.H. holds a Canada Research Chair. I.W. thanks the Juergen Manchot Foundation and the Mukoviszidose e.V., Bonn, Germany (German Cystic Fibrosis Association), for financial support.

#### REFERENCES

1. Bagge, N., M. Schuster, M. Hentzer, O. Ciofu, M. Givskov, E. P. Greenberg, and N. Hoiby. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1175–1187.
2. Balcewich, M. D., T. M. Reeve, E. A. Orlikow, L. J. Donald, D. J. Voadlo, and B. L. Mark. 2010. Crystal structure of the AmpR effector binding domain provides insight into the molecular regulation of inducible AmpC beta-lactamase. *J. Mol. Biol.* **400**:998–1010.
3. Balke, B., L. Hoy, H. Weissbrodt, and S. Haussler. 2004. Comparison of the Micronaut Merlin automated broth microtiter system with the standard agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:765–771.
4. Baquero, F. 2001. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist. Updat.* **4**:93–105.
5. Baquero, F., M. C. Negri, M. I. Morosini, and J. Blázquez. 1998. Selection of very small differences in bacterial evolution. *Int. Microbiol.* **1**:295–300.
6. Blázquez, J., J. M. Gomez-Gomez, A. Oliver, C. Juan, V. Kapur, and S. Martin. 2006. PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **62**:84–99.
7. Boucher, J. C., J. Martinez-Salazar, M. J. Schurr, M. H. Mudd, H. Yu, and V. Deretic. 1996. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J. Bacteriol.* **178**:511–523.
8. Breidenstein, E. B., B. K. Khaira, I. Wiegand, J. Overhage, and R. E. Hancock. 2008. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4486–4491.

9. Cao, L., R. Srikumar, and K. Poole. 2004. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol. Microbiol.* **53**:1423–1436.
10. Craig, W. A. 1997. The pharmacology of meropenem, a new carbapenem antibiotic. *Clin. Infect. Dis.* **24**(Suppl. 2):S266–S275.
11. De Groote, V. N., N. Verstraeten, M. Fauvart, C. I. Kint, A. M. Verbeeck, S. Beullens, P. Cornelis, and J. Michiels. 2009. Novel persistence genes in *Pseudomonas aeruginosa* identified by high-throughput screening. *FEMS Microbiol. Lett.* **297**:73–79.
12. DeVries, C. A., and D. E. Ohman. 1994. Mucoid-to-nonmucoid conversion in alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in *algT*, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. *J. Bacteriol.* **176**:6677–6687.
13. Dötsch, A., T. Becker, C. Pommerenke, Z. Magnowska, L. Jansch, and S. Haussler. 2009. Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2522–2531.
14. Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown, and D. Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:14863–14868.
15. El'Garch, F., K. Jeannot, D. Hocquet, C. Llanes-Barakat, and P. Plesiat. 2007. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1016–1021.
16. Fajardo, A., N. Martinez-Martin, M. Mercadillo, J. C. Galan, B. Ghysels, S. Matthijs, P. Cornelis, L. Wiehlmann, B. Tummler, F. Baquero, and J. L. Martinez. 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One* **3**:e1619.
17. Ghosh, A. S., A. K. Kar, and M. Kundu. 1999. Impaired imipenem uptake associated with alterations in outer membrane proteins and lipopolysaccharides in imipenem-resistant *Shigella dysenteriae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:195–201.
18. Giamarellou, H., and K. Kanellakopoulou. 2008. Current therapies for *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Care Clin.* **24**:261–278.
19. Girgis, H. S., A. K. Hottes, and S. Tavazoie. 2009. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One* **4**:e5629.
20. Girlich, D., T. Naas, and P. Nordmann. 2004. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2043–2048.
21. Godfrey, A. J., L. Hatlelid, and L. E. Bryan. 1984. Correlation between lipopolysaccharide structure and permeability resistance in beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**:181–186.
22. He, J., R. L. Baldini, E. Deziel, M. Saucier, Q. Zhang, N. T. Liberati, D. Lee, J. Urbach, H. M. Goodman, and L. G. Rahme. 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:2530–2535.
23. Hervé, M., A. Boniface, S. Gobec, D. Blanot, and D. Mengin-Lecreulx. 2007. Biochemical characterization and physiological properties of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl-mesodiaminopimelate ligase. *J. Bacteriol.* **189**:3987–3995.
24. Juan, C., B. Moya, J. L. Perez, and A. Oliver. 2006. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1780–1787.
25. King, J. D., D. Kocincova, E. L. Westman, and J. S. Lam. 2009. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun.* **15**:261–312.
26. Kong, K. F., S. R. Jayawardena, S. D. Indulkar, A. Del Puerto, C. L. Koh, N. Hoiby, and K. Mathee. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4567–4575.
27. Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175–176.
28. Laubacher, M. E., and S. E. Ades. 2008. The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **190**:2065–2074.
29. Lee, S. W., E. J. Foley, and J. A. Epstein. 1944. Mode of action of penicillin: I. Bacterial growth and penicillin activity-*Staphylococcus aureus* FDA. *J. Bacteriol.* **48**:393–399.
30. Lewenza, S., R. K. Falsafi, G. Winsor, W. J. Gooderham, J. B. McPhee, F. S. Brinkman, and R. E. Hancock. 2005. Construction of a mini-Tn5-*luxCDABE* mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a tool for identifying differentially regulated genes. *Genome Res.* **15**:583–589.
31. Liberati, N. T., J. M. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, E. Drenkard, G. Wu, J. Villanueva, T. Wei, and F. M. Ausubel. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:2833–2838.
32. Lister, P. D., D. J. Wolter, and N. D. Hanson. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:582–610.
33. Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:194–222.
34. Martinez, J. L., and F. Baquero. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1771–1777.
35. Martinez, J. L., F. Baquero, and D. I. Andersson. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:958–965.
36. Martinez, J. L., A. Fajardo, L. Garmendia, A. Hernandez, J. F. Linares, L. Martinez-Solano, and M. B. Sanchez. 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:44–65.
37. Martinez-Solano, L., M. D. Macia, A. Fajardo, A. Oliver, and J. L. Martinez. 2008. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Infect. Dis.* **47**:1526–1533.
38. Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, and T. Nishino. 2001. Hyper-susceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa* nxB mutant to beta-lactams due to reduced expression of the ampC beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1284–1286.
39. Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, and T. Nishino. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3322–3327.
40. Moya, B., A. Dotsch, C. Juan, J. Blazquez, L. Zamorano, S. Haussler, and A. Oliver. 2009. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* **5**:e1000353.
41. Navon-Venezia, S., R. Ben-Ami, and Y. Carmeli. 2005. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**:306–313.
42. Negri, M. C., M. Lipsitch, J. Blazquez, B. R. Levin, and F. Baquero. 2000. Concentration-dependent selection of small phenotypic differences in TEM beta-lactamase-mediated antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2485–2491.
43. Okamoto, K., N. Gotoh, and T. Nishino. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1964–1971.
44. Oliveros, J. C. 2007 posting date. VENN. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfo.fggp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
45. Pai, H., J. Kim, J. Kim, J. H. Lee, K. W. Choe, and N. Gotoh. 2001. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:480–484.
46. Poole, K. 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol. Life Sci.* **61**:2200–2223.
47. Poon, K. K., E. L. Westman, E. Vinogradov, S. Jin, and J. S. Lam. 2008. Functional characterization of MigA and WapR: putative rhamnosyltransferases involved in outer core oligosaccharide biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**:1857–1865.
48. Queenan, A. M., W. Shang, R. Flamm, and K. Bush. 2010. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:565–569.
49. Ramsey, D. M., and D. J. Wozniak. 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* **56**:309–322.
50. Reguera, J. A., F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, and J. L. Martinez. 1991. Factors determining resistance to beta-lactam combined with beta-lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**:569–575.
51. Reguera, J. A., F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, and J. L. Martinez. 1988. Synergistic effect of dosage and bacterial inoculum in TEM-1 mediated antibiotic resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**:778–779.
52. Schurek, K. N., A. K. Marr, P. K. Taylor, I. Wiegand, L. Semenec, B. K. Khaira, and R. E. Hancock. 2008. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4213–4219.
53. Schweizer, H. P. 1994. A method for construction of bacterial hosts for lac-based cloning and expression vectors: alpha-complementation and regulated expression. *Biotechniques* **17**:452–454, 456.
54. Smith, E. E., D. G. Buckley, Z. Wu, C. Saenphimmachak, L. R. Hoffman, D. A. D'Argenio, S. I. Miller, B. W. Ramsey, D. P. Speert, S. M. Moskowitz, J. L. Burns, R. Kaul, and M. V. Olson. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:8487–8492.
55. Steinkraus, G., R. White, and L. Friedrich. 2007. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001–05. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:788–794.
56. Taccetti, G., S. Campana, A. S. Neri, B. Boni, and F. Festini. 2008. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J. Chemother.* **20**:166–169.
57. Uehara, T., and J. T. Park. 2002. Role of the murein precursor UDP-N-acetyl-

- muramyl-L-Ala-gamma-D-Glu-meso-diaminopimelic acid-D-Ala-D-Ala in repression of beta-lactamase induction in cell division mutants. *J. Bacteriol.* **184**:4233–4239.
58. **Vorachek-Warren, M. K., S. Ramirez, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 2002. A triple mutant of *Escherichia coli* lacking secondary acyl chains on lipid A. *J. Biol. Chem.* **277**:14194–14205.
  59. **Walsh, C.** 2003. Antibiotics that act on cell wall biosynthesis, p. 23–49. *In* C. Walsh (ed.), *Antibiotics: actions, origins, resistance*. ASM Press, Washington, DC.
  60. **Weiss, D. S.** 2004. Bacterial cell division and the septal ring. *Mol. Microbiol.* **54**:588–597.
  61. **Wiedemann, B., D. Pfeifle, I. Wiegand, and E. Janas.** 1998. Beta-lactamase induction and cell wall recycling in gram-negative bacteria. *Drug Resist. Updat.* **1**:223–226.
  62. **Wiegand, I., K. Hilpert, and R. E. Hancock.** 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**:163–175.
  63. **Wiegand, I., A. K. Marr, E. B. Breidenstein, K. N. Schurek, P. Taylor, and R. E. Hancock.** 2008. Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3810–3813.
  64. **Wolter, D. J., N. D. Hanson, and P. D. Lister.** 2005. AmpC and OprD are not involved in the mechanism of imipenem hypersusceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates overexpressing the *mexCD-oprJ* efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4763–4766.
  65. **Wood, L. F., A. J. Leech, and D. E. Ohman.** 2006. Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Roles of sigma (AlgT) and the AlgW and Prc proteases. *Mol. Microbiol.* **62**:412–426.





# RND multidrug efflux pumps: what are they good for?

Carolina Alvarez-Ortega\*, Jorge Olivares and José L. Martínez\*

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

## Edited by:

Fiona Walsh, Agroscope Changins  
Wädenswil, Switzerland

## Reviewed by:

Stefania Stefani, University of  
Catania, Italy  
Thomas Maddox, University of  
Liverpool, UK

## \*Correspondence:

Carolina Alvarez-Ortega and José L.  
Martínez, Departamento de  
Biotecnología Microbiana, Centro  
Nacional de Biotecnología, Consejo  
Superior de Investigaciones  
Científicas, Darwin 3, Cantoblanco,  
28049 Madrid, Spain.  
e-mail: carolina.alvarez@cnb.csic.es;  
jlmtnz@cnb.csic.es

Multidrug efflux pumps are chromosomally encoded genetic elements capable of mediating resistance to toxic compounds in several life forms. In bacteria, these elements are involved in intrinsic and acquired resistance to antibiotics. Unlike other well-known horizontally acquired antibiotic resistance determinants, genes encoding for multidrug efflux pumps belong to the core of bacterial genomes and thus have evolved over millions of years. The selective pressure stemming from the use of antibiotics to treat bacterial infections is relatively recent in evolutionary terms. Therefore, it is unlikely that these elements have evolved in response to antibiotics. In the last years, several studies have identified numerous functions for efflux pumps that go beyond antibiotic extrusion. In this review we present some examples of these functions that range from bacterial interactions with plant or animal hosts, to the detoxification of metabolic intermediates or the maintenance of cellular homeostasis.

**Keywords:** multidrug efflux pumps, host/bacteria interactions, plant/bacteria interactions, quorum sensing, antibiotic resistance, bacterial homeostasis, bacterial virulence

## INTRODUCTION

Multidrug resistance (MDR) efflux pumps are relevant elements that contribute to both intrinsic and acquired resistance to toxic compounds in diverse life forms, including humans where they have a role in resistance to anti-cancer drugs (Wu et al., 2011), to bacteria, where they are involved in resistance to antibiotics (Webber and Piddock, 2003; Li and Nikaido, 2004, 2009; Poole, 2005, 2007). Unlike well-known horizontally acquired antibiotic resistance determinants, MDR efflux pumps are usually chromosomally encoded and the structural components of different systems are highly conserved in all members of a given bacterial species (Saier et al., 1998; Paulsen et al., 2001; Saier and Paulsen, 2001; Paulsen, 2003; Baquero, 2004; Andam et al., 2011). MDR systems are ancient elements, present in bacterial genomes long before the use of antibiotics for the treatment of human infections (Martínez et al., 2009a). This, along with their ubiquity in different organisms, suggests that the main function of these elements goes beyond providing resistance to antibiotics. The fact that quinolones, a family of synthetic antibiotics, constitute a common substrate of MDR efflux pumps supports this notion (Alonso et al., 1999; Hernández et al., 2011b). These observations also suggest that the recent selective pressure imposed by the use of antibiotics is not the main evolutionary driver for MDR efflux pumps (Alonso et al., 2001; Martínez et al., 2009b).

Bacterial MDR efflux pumps can be grouped into five different structural families: the adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) superfamily (Lubelski et al., 2007), the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family (Kuroda and Tsuchiya, 2009), the major facilitator superfamily (MFS) (Pao et al., 1998), the small multidrug resistance (SMR) family (Chung and Saier, 2001), and the resistance/nodulation/division (RND) superfamily (Murakami et al., 2006; Nikaido and Takatsuka, 2009; Nikaido,

2011). The activity of an efflux pump depends on the different types of energy source each system uses: ABC transporters are fueled by ATP hydrolysis; MFS, RND, and SMR use the proton-motive force and MATE transporters consist of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  drug antiport systems (Piddock, 2006a).

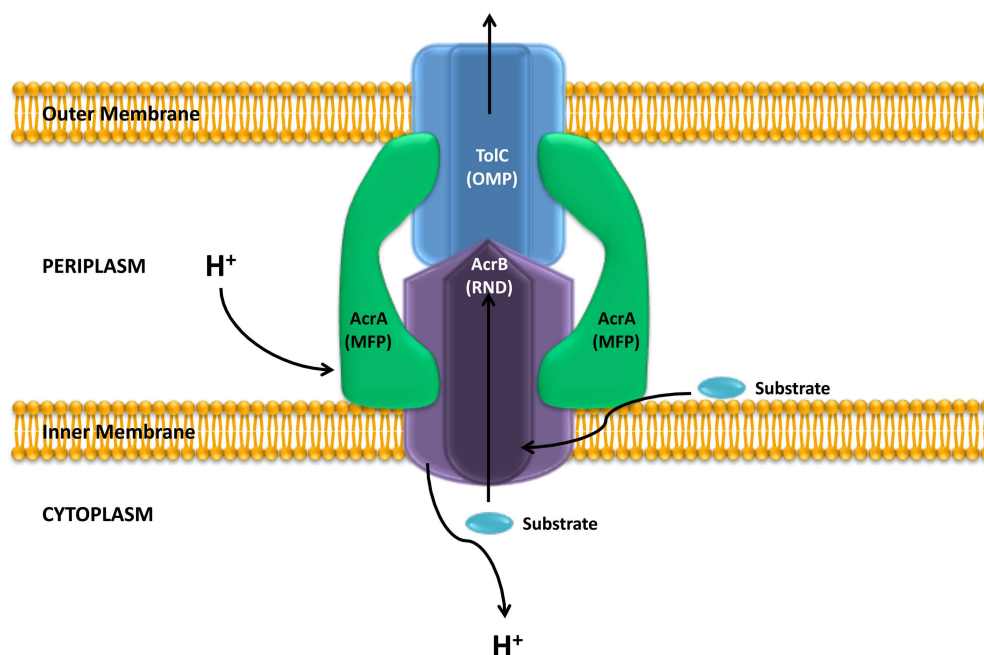
The RND family includes several members that are relevant to antibiotic resistance in Gram-negative bacteria, whereas the MATE family has been mainly associated to resistance in Gram-positive microorganisms (Piddock, 2006a; Vila and Martínez, 2008). This review will focus exclusively on RND efflux systems.

The crystallographic analysis of AcrB, a model member of the RND family, revealed that this protein forms a homotrimer (Murakami et al., 2002; Nakashima et al., 2011), that associates into a tripartite complex along with an outer membrane protein (OMP, TolC) and a periplasmic membrane-fusion protein (MFP, AcrA; **Figure 1**). Usually the genes encoding for these proteins are found in a single operon, however, the gene encoding for the OMP can also be found elsewhere in the chromosome, as it happens with TolC in *Escherichia coli* (Koronakis et al., 2000, 2004); or is part of an operon encoding for a different efflux pump (**Figure 2**). The *Pseudomonas aeruginosa* RND efflux pump MexXY is an example of the latter, where the system uses the OprM porin encoded in the *mexAB-OprM* operon (**Figure 2**; Mine et al., 1999).

In this review we will address the different functional roles that RND efflux pumps may have in addition to mediating antibiotic resistance. Exhaustive information on structure, regulatory aspects, and antibiotic resistance can be found elsewhere (Saier et al., 1998; Paulsen et al., 2001; Saier and Paulsen, 2001; Paulsen, 2003; Webber and Piddock, 2003; Li and Nikaido, 2004, 2009; Poole, 2004, 2007; Piddock, 2006a; Blair and Piddock, 2009; Nikaido, 2009, 2011; Nikaido and Takatsuka, 2009).

Some of the most relevant roles so far identified include involvement in bacterial virulence (Piddock, 2006b), plant-bacteria





**FIGURE 1 | Structure of an RND efflux pump.** The figure shows a scheme of the structure of the *E. coli* AcrAB-TolC system. As shown, the system is a tripartite complex formed by the inner membrane AcrB protein, the outer membrane protein TolC and the membrane fusion protein AcrA. The activity of

the AcrB RND protein is coupled to the proton gradient. It has been shown that these efflux pumps can extrude different compounds from the bacterial cytoplasm and the periplasm. Adapted from Blair and Piddock (2009).

interactions (Maggiorani Veleccillo et al., 2006), trafficking of quorum sensing molecules (Evans et al., 1998; Kohler et al., 2001), and detoxification processes from metabolic intermediates, and toxic compounds such as heavy metals, solvents, or antimicrobials produced by other microorganisms (Aendekerk et al., 2002, 2005; Ramos et al., 2002; Nies, 2003; Sekiya et al., 2003; Burse et al., 2004a). A comprehensive review of all potential functions identified to date for all RND efflux pumps is beyond the scope of this review. Instead, we would like to discuss some selected examples of the ecological role that these systems may have in the absence of antibiotics. As stated above, we believe that the evolution of bacterial RND efflux pumps has been primarily driven by their physiological functions and not by the selective pressure imposed by the relatively recent human use of antibiotics. We consider the important role RND efflux pumps currently play in antibiotic resistance to be an evolutionary novelty stemming from the aforementioned use of antibiotics by humankind (Martinez, 2008; Baquero et al., 2009).

## REGULATION OF RND EFFLUX SYSTEMS BY NATURAL EFFECTORS

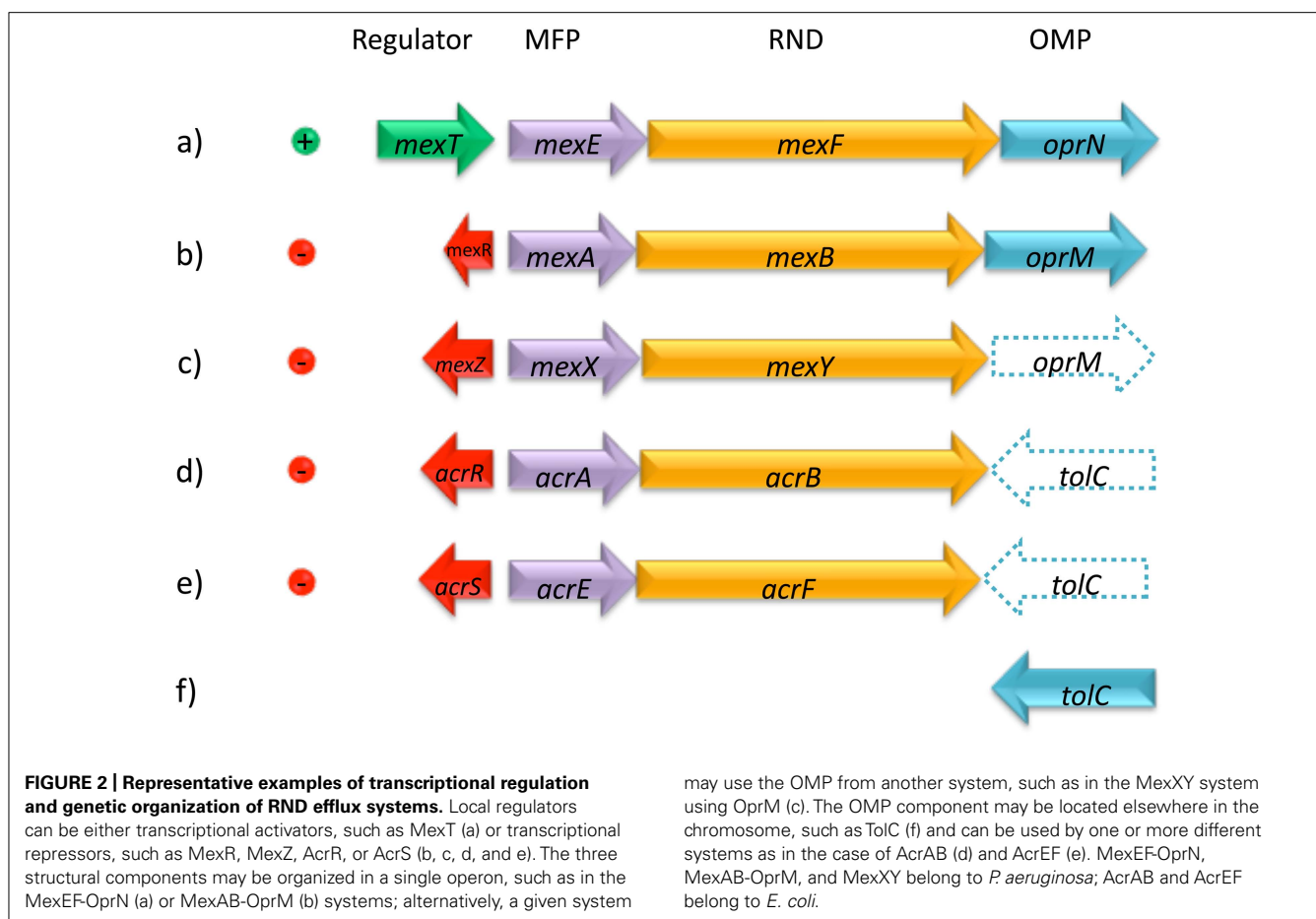
The regulation of bacterial RND efflux systems is often mediated by global and local regulators, resulting in a multilayered control to optimize gene expression in response to specific cues. A number of positive and negative regulators along with their known mechanism of action have been reviewed elsewhere (Grkovic et al., 2002; Li and Nikaido, 2009).

In most cases a transcriptional regulator (typically a repressor) is encoded upstream the operon coding for the efflux pump

(Figure 2). This local regulator usually keeps expression of the efflux pump at a very low-level. High-level expression can be achieved either through an effector-mediated release of the repressed state or through mutations in one or more regulators (Hernandez et al., 2009, 2011a). Activation may occur at different levels: (1) By inactivation of the local repressor that blocks the expression of the pump's structural genes such as AcrR in *E. coli* (Ma et al., 1996), MexR in *P. aeruginosa* (Poole et al., 1996; Sanchez et al., 2002c), or SmeT in *Stenotrophomonas maltophilia* (Sanchez et al., 2002a); (2) By activation of a global transcriptional regulator like SoxS, RobA, or RamA in *E. coli* (Martin et al., 2008; Zhang et al., 2008; Perez et al., 2012); (3) By switching on-off one or more steps that interlink regulatory cascades such as MtrR of *Neisseria gonorrhoeae* (Johnson et al., 2011); and (4) Through the emergence and selection of mutations in key genes like *mexT* in *P. aeruginosa* (Kohler et al., 1999).

Multidrug efflux pumps extrude a wide range of substrates. However, the number of effectors regulating them is lower in comparison. Understanding the mechanisms of regulation may help in deciphering the function of RND efflux pumps, since it is expected that different effectors trigger expression only when a given pump is required. RND efflux systems whose expression is controlled by natural inducers normally encountered during the course of infective processes have been studied in detail. Induction of expression by bile salts and fatty acids in enteric bacteria are perhaps the best studied examples of substances capable of modulating expression of these systems.

Expression of the *acrAB* system in *E. coli* is induced by decanoate and unconjugated bile salts usually encountered by the



organism in the intestinal tract (Ma et al., 1995). The mechanism involves binding of these effectors to the Rob transcriptional regulator (Rosenberg et al., 2003). Bile salts also induce expression of *acrAB* in *Salmonella*, however, in this case the effector binds the RamA transcriptional regulator (Nikaido et al., 2008). Interestingly, in both cases the inducer is also a substrate for the efflux system, thus allowing the cell to respond quickly to deleterious environmental substances. Additional examples of bile salts-mediated induction include the *cmeABC* system in *Campylobacter jejuni*, the *vexD* gene in *Vibrio cholerae* and various RND-type efflux system genes in *Bacteroides fragilis* (Lin et al., 2005b; Pumbwe et al., 2007). These examples strongly suggest that these systems are relevant to bacterial adaptation for surviving in the gut and that this may be their original function.

In this regard, it has been suggested that some efflux pumps from human commensals and pathogens have evolved to overcome the innate immunity of the host (Blair and Piddock, 2009). For instance, the susceptibility to vertebrate antibacterial peptides in *N. gonorrhoeae* depends on the activity of the MtrCDE RND efflux pump (Shafer et al., 1998). Notably, this efflux pump is required to achieve mutation-driven resistance to penicillin in *N. gonorrhoeae* (Veal et al., 2002) and overexpression mutants present reduced susceptibility to several antibiotics and show an increase in *in vivo* fitness (Warner et al., 2007). MtrCDE (Jerse et al., 2003), enhances experimental gonococcal genital tract infections in female mice,

whereas the FarAB-MtrE efflux pump (Lee and Shafer, 1999) is not needed to colonize this environment. It has been suggested that FarAB-MtrE is important for the resistance of *N. gonorrhoeae* to certain long-chained fatty acids that are present in the rectum (Lee and Shafer, 1999). Altogether these studies indicate that *N. gonorrhoeae* harbors efflux pumps each one responding to different environmental cues that enable adaptation for survival in different ecosystems.

Metal cations are another example of natural compounds capable of inducing expression of RND efflux pumps. Metals are required as cofactors in several bacterial processes. However, they are toxic at high concentrations. Consequently, bacteria harbor systems to maintain the cellular metal homeostasis. In some cases, this regulation implies that the efflux pump is involved in the extrusion of these toxic effectors (Nies, 2003). However, in other cases the situation is more complex and the effector is simply an environmental cue that indicates the type of ecosystem surrounding the organism. The *cusCBA* system in *E. coli* and *mtrCDE* system in *N. gonorrhoeae* constitute two of the most studied examples of metal-induced regulation among pathogenic bacteria. The CusCBA system confers tolerance to copper and silver ions (Franke et al., 2001; Grass and Rensing, 2001). Both substrates serve as natural inducers for *cusCBA* expression (Franke et al., 2001; Yamamoto and Ishihama, 2005), suggesting that this RND efflux pump may have been first selected to overcome the toxicity of these

metals. As stated above, the MtrCDE system is involved in resistance to host-derived antibacterial peptides (Shafer et al., 1998). It was recently reported that *mtrCDE* expression is indirectly regulated by free levels of iron through the regulation of its major transcriptional repressor, MtrR, by the MpeR transcriptional regulator (Mercante et al., 2012). Under the proposed model, expression of the efflux system would increase under iron-limited conditions, a situation that bacteria can encounter over the course of the infection process (Martinez et al., 1990). The *P. aeruginosa* CzcABC efflux system confers tolerance to zinc, cadmium, and cobalt and constitutes another example of metal-induced expression. The regulation occurs through the metal-inducible CzcRS two-component system that is activated in the presence of the system's substrates or indirectly in the presence of copper (Caille et al., 2007; Dieppois et al., 2012).

### THE ROLE OF EFFLUX PUMPS IN PLANT-BACTERIA INTERACTIONS

The rhizosphere is a complex ecosystem characterized by a high microbial activity that results in a bacterial population density that can be two orders of magnitude higher than in bulk soil (Matilla et al., 2007). The structure of the rhizosphere's microbiota is governed by the release of nutrients through plant root exudates and by the ecological relationships of the microorganisms present in this ecosystem. A transcriptomic analysis of *Pseudomonas putida* grown in the rhizosphere of maize revealed that the expression of different efflux pumps is induced in this ecosystem (Matilla et al., 2007), thus suggesting a relevant function for the colonization of this environment. Plant exudates have been identified as good effectors of RND efflux pumps, and it has been shown that these secondary metabolites bind regulators of RND efflux pumps such as TtgR (Alguel et al., 2007), the local repressor of the TtgABC system in *P. putida* (Teran et al., 2003). Some compounds produced by plants have antibacterial effects and it has been described the RND efflux pumps are required from the first steps of bacterial plant colonization (Espinosa-Urgel et al., 2000) to survival in plant tissues (Barabote et al., 2003), possibly due to their involvement in protection against these compounds. This is the case of *Erwinia amylovora*, the cause of fire blight disease in rosaceous plants (Eastgate, 2000). The plantlet toxic metabolites naringenin and phloretin are good inducers of the efflux pump *acrAB* in this bacterial species, and *E. amylovora* *acrAB* mutants are much less virulent than their wild-type counterpart (Burse et al., 2004b). A similar situation occurs in *Agrobacterium tumefaciens*. Coumestrol, an antimicrobial root-exudated flavonoid, is both a substrate and an inducer of expression of the *ifeABR* efflux system (Palumbo et al., 1998). The fact that this system is needed for effective root colonization indicates that it plays an important role in *A. tumefaciens* resistance to plant-produced antimicrobials.

Comprehensive analyses on *Erwinia chrysanthemi* RND efflux pumps revealed that each system may differentially contribute to host specificity. Mutants defective in each of the pumps were differently affected in their virulence in diverse hosts and the susceptibility to plant-produced antimicrobials was specific for each pump (Maggiorani Valecillos et al., 2006). As discussed in the case of *N. gonorrhoeae*, this suggests that each of the several efflux

pumps encoded in the genome of a given bacterial species may have a different function. This adaptation does not rely exclusively on the extrusion of toxic antimicrobial plant exudates. For instance, salicylic acid, an important signaling molecule produced by plants (Loake and Grant, 2007), induces the expression of the *E. chrysanthemi* efflux pumps *acrAB* and *emrAB* (Ravirala et al., 2007). This indicates that RND efflux pumps are relevant elements mediating bacteria/plant interactions at different levels that include the response to toxic compounds, host specificity and interspecies signal trafficking. This functional role is not confined to plant-infective bacteria. Mutants of the mutualistic symbiont *Rhizobium etli* lacking the RmrAB efflux pump form fewer nodules on its host *Phaseolus vulgaris* than the corresponding wild-type strain (Gonzalez-Pasayo and Martinez-Romero, 2000). Similarly, the SmeAB efflux pump plays an important role in the nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* (Eda et al., 2011). The effect of efflux pumps on plant-bacteria interactions can be host-specific. For instance, BdeAB from *Bradyrhizobium japonicum* is needed for the symbiotic nitrogen-fixation activity on soybean, but not on other host plants such as mung bean and cowpea (Lindemann et al., 2010).

### THE ROLE OF EFFLUX PUMPS IN BACTERIAL VIRULENCE

From a clinical point of view, antibiotic resistance could be considered as a colonization factor since only those organisms surviving within a treated patient will be able to cause an infection (Martinez and Baquero, 2002). However, in this section we would like to address the direct role that RND efflux pumps play in the virulence of different human pathogens. As mentioned in a previous section, the expression of different RND efflux pumps is triggered by human-produced compounds, and they contribute to the colonization of different environments in the human host. Although the role of efflux pumps on virulence has been studied for several organism (Piddock, 2006b), only in a few cases comprehensive studies including different systems from a single bacterial species have been performed. Below we discuss some of these examples

#### *Vibrio cholerae* RND EFFLUX PUMPS AND VIRULENCE

*Vibrio cholerae* possesses six different operons encoding for RND-type efflux systems: *vexAB*, *vexCD* (*breAB*), *vexEF*, *vexGH*, *vexIJK*, and *vexLM* (Kitaoka et al., 2011). While different RND efflux systems often share an OMP, it is rather common that operons encode for a cognate OMP for each system (Figure 2). In the case of *V. cholerae*, it seems that all six different RND efflux systems operate with the same OMP, encoded by the *tolC* gene (Bina et al., 2008; Cerda-Maira et al., 2008).

During the course of *V. cholerae* infections, bacteria colonize primarily the small intestine, where they penetrate the mucus lining coating the intestinal epithelium. In addition to factors produced by the innate immune system, the intestinal environment is rich in substances such as bile salts and organic acids that are capable of inhibiting bacterial growth (Reidl and Klose, 2002). Predictably, four *V. cholerae* RND efflux systems have been implicated in *in vitro* resistance to bile salts and detergents similar to detergent-like molecules the organism is likely to encounter during colonization of the intestinal epithelium.



Susceptibility studies with single and multiple mutant combinations revealed that VexB has broad substrate specificity and that it is the primary RND efflux system responsible for resistance to bile salts *in vitro* (Bina et al., 2008). VexD, VexK, and VexH have also been implied in resistance to bile salts, which denotes redundancy among the different RND efflux systems (Taylor et al., 2012). Moreover, the expression of *vexD* is induced in the presence of bile salts (Cerdeira-Maira et al., 2008). The VexK and VexH contribution to bile salts resistance is only evident in a  $\Delta vexBD$  double mutant background, which suggests a supportive role for VexK and VexH. However, as Taylor et al. (2012) point out, this hierarchy might be limited to their *in vitro* experimental conditions. In fact, the increasing attenuation levels displayed by combination mutants in *in vivo* colonization experiments ( $\Delta vexBDK < \Delta vexBDH < \Delta vexBDHK < \Delta RND$ ), suggest that VexH plays a more relevant role than VexK during the infection process.

RND efflux systems are also required for optimal expression of the genes encoding for two of the most important *V. cholerae* virulence factors: cholera toxin (CT) and the toxin-coregulated pilus (TCP). A  $\Delta RND$  mutant exhibited decreased transcription of the *tcpA* and *toxT* genes, the latter encoding for a transcriptional activator responsible for transcription of the genes encoding for CT, and a concomitant decrease in CT and TCP production (Bina et al., 2008). While VexB is able to complement this phenotype, a *vexBDHK* still exhibits a decrease in CT and TCP, thus suggesting a role for VexM and VexF in virulence factor production (Bina et al., 2008; Taylor et al., 2012).

The mechanism through which the *V. cholerae* RND efflux systems modulate the production of virulence factors has not been elucidated. However, it has been proposed that deletion of systems with redundant functions could lead to the accumulation of a low molecular weight molecule that normally functions as a negative effector molecule involved in fine-tuning the expression of the affected virulence factors (Taylor et al., 2012). *V. cholerae* inhabits aquatic environments where it normally grows associated with zooplankton or egg masses (Reidl and Klose, 2002). It is possible that some of the RND efflux systems have dedicated functions specific to this portion of the organism's life cycle. This may be particularly true for VexM and VexF, for which no function in resistance to bile salts and antimicrobials has been identified to date.

### ***Mycobacterium tuberculosis* RND EFFLUX PUMPS AND VIRULENCE**

The *M. tuberculosis* genome possesses 13 different genes encoding for RND proteins (Cole et al., 1998). Several domains in these proteins are unique to mycobacteria and are thus designated as MmpL (Mycobacterial membrane protein Large). Four *mmpL* genes appear to be in operons also containing an *mmpS* gene. The latter are predicted to encode for proteins equivalent to the MFPs in other bacterial RND systems (Domenech et al., 2005).

In spite of the documented *M. tuberculosis* resistance against first and second line antimicrobial therapy, none of the RND systems have been associated with antibiotic efflux to date, the only possible exception being MmpL7, which is capable of conferring

isoniazid resistance when overexpressed in *Mycobacterium smegmatis* (Pasca et al., 2005; De Rossi et al., 2006; da Silva et al., 2011). Moreover, deletion mutants created in 11 *mmpL* genes failed to exhibit significantly altered drug susceptibility in *M. tuberculosis* (Domenech et al., 2005).

The primary role of most MmpL proteins appears to be the transport of lipids to be incorporated on the cell envelope. The complex mycobacterial cell wall is composed of peptidoglycan, arabinogalactan, and mycolic acids, the surface of which is covered by non-covalently associated lipids that include trehalose monomycolate (TMM), trehalose dimycolate (TDM), sulfolipids, phenolic glycolipids, and phthiocerol dimycocerosates (PDIMs; Tahlan et al., 2012). These lipids play important roles in protection against host-derived toxic molecules, bear an immunomodulatory activity and contribute to *M. tuberculosis* pathogenicity (Neyrolles and Guilhot, 2011). Lipid transport functions have been ascribed to MmpL3, MmpL7, and MmpL8, and in some cases deletion mutants have demonstrated the contribution of additional MmpL proteins to host survival and pathogenicity.

The inability to create an *mmpL3* deletion mutant combined with its absence in transposon mutant collections suggests that this gene is essential to *M. tuberculosis* (Domenech et al., 2005; Lamichhane et al., 2005). A recent study aimed at identifying the target of a novel *M. tuberculosis* antibiotic found data that suggests that MmpL3 transports TMM out of the cell and that its inhibition prevents the incorporation of *de novo*-synthesized mycolic acids into the cell envelope (Tahlan et al., 2012).

MmpL7 is required for PDIM transport to the cell surface and was the first MmpL protein implicated in lipid transport in *M. tuberculosis* (Cox et al., 1999). In addition, MmpL7 appears to function as a scaffold for the PpsE polyketide synthase required for the final step of phthiocerol synthesis, thus coupling transport and synthesis (Jain and Cox, 2005). At least two different studies have determined that *mmpL7* mutants display an attenuation phenotype in murine virulence models (Cox et al., 1999; Domenech et al., 2005). MmpL8 has been implicated in the transport of the SL-N, a precursor of the SL-1 sulfolipid, with a similar mechanism to that of MmpL7 where synthesis and transport appear to be coupled (Converse et al., 2003; Domenech et al., 2004). *mmpL8* mutants also display attenuated lethality in murine virulence models (Converse et al., 2003; Domenech et al., 2004, 2005).

Domenech et al. (2005) determined that an *mmpL4* mutant has both impaired growth kinetics and impaired lethality in a virulence murine model. The same study determined that while an *mmpL11* mutant shows a growth pattern similar to that of the wild-type during the active growth phase, the mutant is attenuated during the course of chronic infections in an *in vivo* model. No substrate has been identified for these transporters. A role in heme uptake has been recently proposed for MmpL11 and such a function would be in line with the attenuated virulence phenotype observed with an *mmpL11* mutant (Tullius et al., 2011). Furthermore, a role in extrusion of host-derived antimicrobials similar to that observed for *V. cholerae* RND efflux systems cannot be ruled out for those MmpL proteins that appear to be involved in the *M. tuberculosis* infection process.

### ***Helicobacter pylori* RND EFFLUX PUMPS AND VIRULENCE**

The gastric colonizer *Helicobacter pylori* possesses three different operons encoding for RND efflux systems (Tomb et al., 1997). Over the years the systems have received different nomenclatures that may often lead to confusion when revising the literature: hp0605–hp0607 is also referred to as *hefABC*; hp0969–hp0971 was originally denominated as *hefFDE* and is currently known as *cznABC*; finally, the system encoded by hp1329–hp1327 was originally named *hefIHG* and currently hp1329 and hp1328 are known as *czcA* and *czcB*, respectively, while hp1327 is known as *crdB*.

Bina et al. (2000) initially assessed *in vitro* and *in vivo* expression profiles of each system as well as the individual contribution to intrinsic antibiotic susceptibility. The study revealed that hp0607 (*hefC*) and hp0969 (*hefF*) are expressed both in *in vivo* and *in vitro*, while hp1329 (*hefI*) is only expressed *in vivo*. Knockouts in each system failed to identify a contribution to intrinsic antibiotic susceptibility with 19 different compounds. However, overexpression of selected components has been associated with antibiotic resistance and different studies revisiting the contribution of each system to antibiotic susceptibility determined that hp0607 (*hefC*) and hp0605 (*hefA*) are involved in intrinsic antibiotic resistance to diverse antibiotics (Kutschke and de Jonge, 2005; Liu et al., 2008; Hirata et al., 2010; Tsugawa et al., 2011).

*H. pylori* is exposed to bile salts resulting from reflux into the human stomach; bile salts have an inhibitory effect on *H. pylori* growth, yet the ability to thrive in the presence of a bile gradient suggests that this organism has bile resistance mechanisms in place (Worku et al., 2004; Shao et al., 2008). HefC was recently found to play a role in resistance to bile salts and ceragenins (synthetic bile salt derivatives with antimicrobial activity; Trainor et al., 2011). A *hefC* mutant exhibited increased susceptibility to deoxycholate, cholate, glycodeoxycholate, taurodeoxycholate, taurocholate and to ceragenin 11(CSA 11); while no changes in susceptibility were observed with mutants in the other two efflux systems. Moreover, HefC appears to have substrate specificity for bile salts, since no change in susceptibility was observed with detergents. Although direct efflux of bile salts through HefC has not been experimentally demonstrated yet, it is likely that this system contributes to *H. pylori* successful colonization of bile-containing environments.

During the course of gastric colonization, *H. pylori* is exposed to additional environmental stresses, including low pH gradients (4.0–6.0) and acid shock. Acidic environments impact the bioavailability of metals like iron and nickel, which play an essential role in bacterial metabolism. In addition, environmental metal fluctuations are expected to arise from damaged epithelium and diffusion from ingested food (Stoof et al., 2008). Maintaining a cytoplasmic metal homeostasis is crucial to bacteria, as excessive concentrations can lead to severe cellular damage. The other two *H. pylori* RND efflux systems are involved in metal efflux.

The system encoded by hp1327–1329 (*crdB*, *czcB*, and *czcA*) constitutes a novel copper efflux pump. Expression of hp1329 is induced in the presence of copper and growth of hp1327 and hp1328 mutants is inhibited in the presence of this metal (Waidner et al., 2002). The same study found that expression of

hp1326 (renamed as *crdA*), encoding for a secreted protein, is strongly induced in the presence of copper and growth of an hp1326 mutant was also impaired in the presence of copper. hp1326 is transcribed as a monocistronic unit, but is believed to constitute a copper resistance system along with hp1327–1329. A follow up study revealed that copper-mediated expression of hp1326 requires the CrdRS two-component system (Waidner et al., 2005); the study did not address expression of hp1327–1329. Mutants lacking the CrdRS system are unable to colonize the stomach of mice (Panthelet et al., 2003). This suggests that hp1326 and hp1327–1329 might play an important role during the infective process of *H. pylori*.

The RND efflux system encoded by hp0969–0971 (renamed as *cznABC*) has been implicated in cadmium, zinc, and nickel resistance (Stahler et al., 2006). Stahler et al. (2006) showed growth inhibition of individual mutants in the presence of these metals. The *H. pylori* urease, a nickel-containing enzyme, is an essential colonization factor that enables survival in acidic conditions. Urease activity and expression is regulated in response to nickel availability (van Vliet et al., 2001), accordingly, *cznC* and *cznA* mutants exhibited enhanced urease activity (Stahler et al., 2006). The authors propose that the *cznABC* system plays an important role in fine-tuning urease activity, as nickel efflux reduces activity, while cadmium and zinc efflux prevents inhibition of this enzyme. High urea concentrations are toxic at neutral pH, therefore, untimely activation of this enzyme resulting from perturbations in metals homeostasis can be detrimental to the cell (Meyer-Rosberg et al., 1996; Rektorschek et al., 1998). The inability of *cznA*, *cznB*, and *cznC* mutants to achieve gastric colonization in a gerbil animal model and the failure of a *cznA* mutant to survive in acidic conditions might be linked to urease activity (Bijlsma et al., 2000; Stahler et al., 2006).

### **EFFLUX PUMPS AND GLOBAL BACTERIAL PHYSIOLOGY**

One of the putative functions of RND efflux pumps is detoxification from detrimental intermediates derived from bacterial metabolism (Neyfakh, 1997). Studies on this subject have been mainly performed using mutants that overproduce RND efflux pumps. It is conceivable that overexpression of these elements might cause a metabolic burden on bacterial populations (Martinez et al., 2007, 2011; Andersson and Hughes, 2010). Indeed, different publications have shown that overproduction of RND efflux pumps may impact bacterial physiology (Sanchez et al., 2002b; Ruiz-Diez et al., 2003; Alonso et al., 2004; Linares et al., 2005; Lertpiriyapong et al., 2012; Olivares et al., 2012). Moreover, the uncontrolled production of these elements can affect the ability of pathogenic bacteria to infect experimental animal models, seriously impairing their virulence (Cosson et al., 2002; Hirakata et al., 2002; Warner et al., 2007; Lertpiriyapong et al., 2012; Perez et al., 2012).

The energy expenditure required to constantly maintain the activity of an efflux pump could lead to a fitness reduction upon overproduction of these elements. However, our group has recently shown that overproduction of the *P. aeruginosa* MexEF-OprN efflux system does not produce a fitness cost as measured in classical competition tests, although it alters several physiological aspects, including elements relevant for *P. aeruginosa* virulence

such as Type III and Type VI secretion (Tian et al., 2009a,b; Olivares et al., 2012). Notably, this effect is specific to each pump and might be associated to their functional role, as overexpression of either MexAB-OprM or MexXY does not produce the same effect (Linares et al., 2005).

As mentioned before, efflux pumps might be involved in the elimination of endogenous toxic compounds. The *P. aeruginosa* MexGHI-OpmD efflux system might be implicated in the extrusion of anthranilate, a toxic intermediate of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) synthetic pathway (Aendekerk et al., 2002, 2005; Sekiya et al., 2003), whereas MexEF-OprN extrudes kynurenine, another intermediate in the same pathway (Olivares et al., 2012). A recent study has shown that kynurenine and its derivatives have relevant effects in different human diseases, including modulation of the activation of glutamate and nicotinic receptors, the modification of the immune response in situations of inflammation and infection, and the generation and removal of reactive oxygen species (Stone et al., 2012). Any potential impact that the constant extrusion of kynurenine by a MexEF-OprN overexpression mutant may have on the pathogenic behavior of *P. aeruginosa* remains to be established.

*Pseudomonas* quinolone signal is one of the quorum sensing (QS) signals produced by *P. aeruginosa* (Mcknight et al., 2000). Strains overexpressing MDR efflux pumps capable of extruding QS signals or their intermediates are likely to be impaired in the QS response. Indeed, overexpression of MexEF-OprN impairs the QS response of *P. aeruginosa* (Kohler et al., 2001; Olivares et al., 2012). Previous studies also showed that MexAB-OprM likely extrudes the 3O12-HSL QS signal (Evans et al., 1998; Pearson et al., 1999), and that overproduction of this efflux pump reduced the expression of selected QS-regulated genes. The *P. aeruginosa* QS regulon comprises approximately 5% of this organism's genome (Schuster et al., 2003); including several genes involved in virulence. Expression of some of these genes might be energetically costly. However, once the QS signals reach a specific threshold, expression of the regulon is maintained. It has been suggested that being signal-blind can be a good adaptive strategy to avoid this energetic burden (Haas, 2006). Whether the efflux pump-mediated extrusion of QS signals may be beneficial to *P. aeruginosa* under specific conditions remains to be determined.

Efflux pumps may also compensate for the effects that other bacterial elements may have on the organism. This might be the case of *C. jejuni*, a leading cause of food-borne enterocolitis worldwide (Ruiz-Palacios, 2007). As an intestinal pathogen this bacterium must overcome the antimicrobial effects of the bile salts secreted into the intestinal tract (Hofmann and Eckmann, 2006). The RND-type efflux pump CmeABC confers resistance to a broad range of antibacterial substances including bile salts, fatty acids, and detergents (Lin et al., 2005a). On the other hand, it has been demonstrated that the type VI secretion system (T6SS) plays a key role in the colonization of the intestinal tract (Lertpiriyapong et al., 2012). The activation of the T6SS may enable bile salts to enter inside the bacterium through the open secretion channel (Bidlack and Silverman, 2004); and this can compromise bacterial viability and infective capability. Bile salts trigger the expression of the CmeABC efflux pump; which extrudes the bile salts immediately outside the cell thus

alleviating the entrance through the T6SS (Lin et al., 2005b). The functional interaction between the T6SS and CmeABC might be crucial for intestinal colonization by *C. jejuni*, thus playing a key role in the virulence of this bacterial pathogen (Lertpiriyapong et al., 2012).

Given the integration of RND efflux systems in bacterial metabolic networks, it is not surprising that their regulation is also incorporated in global regulatory networks. Global regulators such as MarA, RamA, and SoxS can activate the expression of efflux pumps such as AcrAB-TolC in *E. coli* and in additional *Enterobacteriaceae* (Davin-Regli et al., 2008). Similarly, the pleiotropic regulator MgrA (Luong et al., 2006) controls autolysis, virulence, biofilm formation, and efflux pump activity in *Staphylococcus aureus* (Ingavale et al., 2003, 2005; Truong-Bolduc et al., 2003, 2005; Trottonda et al., 2008). The control of efflux pumps by this global regulator is specific for each pump. Increased expression of *mgrA* *in vivo* in a subcutaneous abscess model upregulates expression of the *norB* and *tet38* efflux pumps, whereas expression of *norA* and *norC* is downregulated (Ding et al., 2008). The relevance of these pumps for the *in vivo* growth of *S. aureus* has been studied; *norB* and *tet38* defective mutants present a growth defect in a mice abscess model and the phenotype was not attributable to a staphylococcal stress response (Deng et al., 2012).

MexT, the transcriptional activator of MexEF-OprN in *P. aeruginosa* (Figure 2), constitutes another example of global regulation. MexT regulates the expression of several *P. aeruginosa* genes (Tian et al., 2009a). A portion of this regulation is mediated by the activity of the pump through the extrusion of a precursor of the PQS QS signal, and the concomitant impairment of the QS response (Olivares et al., 2012). However, the expression of other genes is directly regulated by MexT (Tian et al., 2009a). A recent study demonstrated that MexT functions as a redox-responsive regulator (Fargier et al., 2012), indicating that it might be involved in controlling cellular redox homeostasis. The fact that a local transcriptional regulator of an efflux pump behaves as a global regulator further supports the involvement of these elements in general processes of bacterial physiology and not simply as a response to the presence of antibiotics in the environment.

## CONCLUDING REMARKS

The emergence of antibiotic resistance in bacterial human pathogens is a very recent process in the evolutionary timescale. It is often assumed that resistance genes have been mainly originated in antibiotic producers where they play a detoxification role (Benveniste and Davies, 1973; Webb and Davies, 1993; Davies, 1997). However, in the few cases where the origin of resistance genes has been tracked, the original hosts are not antibiotic producers. The *QnrA* gene from *Shewanella algae* constitutes a prime example, as it confers resistance to quinolones, which are synthetic antibiotics (Poirel et al., 2005). This indicates that, at least in some cases, antibiotic resistance would be an emergent function that has been recently selected due to the use of antibiotics for treating infections (Martinez, 2008, 2009a,b; Baquero et al., 2009; Fajardo et al., 2009). As we have seen in this review, MDR efflux pumps also fall within this category, since they



exhibit multiple functions relevant to bacterial physiology in addition to mediating antibiotic resistance. A complete understanding of these functions is important in order to define the networks that connect antibiotic resistance with other basic physiological processes (Linares et al., 2010; Martinez and Rojo, 2011), both during the course of infections and in natural, non-clinical ecosystems.

## REFERENCES

- Aendekerk, S., Diggle, S. P., Song, Z., Hoiby, N., Cornelis, P., Williams, P., et al. (2005). The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* 151, 1113–1125.
- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 148, 2371–2381.
- Alguel, Y., Meng, C., Teran, W., Krell, T., Ramos, J. L., Gallegos, M. T., et al. (2007). Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J. Mol. Biol.* 369, 829–840.
- Alonso, A., Morales, G., Escalante, R., Campanario, E., Sastre, L., and Martinez, J. L. (2004). Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 432–434.
- Alonso, A., Rojo, F., and Martinez, J. L. (1999). Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ. Microbiol.* 1, 421–430.
- Alonso, A., Sanchez, P., and Martinez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 3, 1–9.
- Andam, C. P., Fournier, G. P., and Gogarten, J. P. (2011). Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 756–767.
- Andersson, D. I., and Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 260–271.
- Baquero, F. (2004). From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 510–518.
- Baquero, F., Alvarez-Ortega, C., and Martinez, J. L. (2009). Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 469–476.
- Barabote, R. D., Johnson, O. L., Zetina, E., San Francisco, S. K., Fralick, J. A., and San Francisco, M. J. (2003). *Erwinia chrysanthemi* tolC is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J. Bacteriol.* 185, 5772–5778.
- Benveniste, R., and Davies, J. (1973). Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 2276–2280.
- Bidlack, J. E., and Silverman, P. M. (2004). An active type IV secretion system encoded by the F plasmid sensitizes *Escherichia coli* to bile salts. *J. Bacteriol.* 186, 5202–5209.
- Bijlsma, J. J., Lie, A. L. M., Nootenboom, I. C., Vandenbroucke-Grauls, C. M., and Kusters, J. G. (2000). Identification of loci essential for the growth of *Helicobacter pylori* under acidic conditions. *J. Infect. Dis.* 182, 1566–1569.
- Bina, J. E., Alm, R. A., Uria-Nickelsen, M., Thomas, S. R., Trust, T. J., and Hancock, R. E. (2000). *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 248–254.
- Bina, X. R., Provenzano, D., Nguyen, N., and Bina, J. E. (2008). *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect. Immun.* 76, 3595–3605.
- Blair, J. M., and Piddock, L. J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 512–519.
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M. S. (2004a). NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in in vitro competition with other epiphytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 693–703.
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M. S. (2004b). The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 43–54.
- Caille, O., Rossier, C., and Perron, K. (2007). A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189, 4561–4568.
- Cerda-Maira, F. A., Ringelberg, C. S., and Taylor, R. K. (2008). The bile response repressor BreR regulates expression of the *Vibrio cholerae* breAB efflux system operon. *J. Bacteriol.* 190, 7441–7452.
- Chung, Y. J., and Saier, M. H. Jr. (2001). SMR-type multidrug resistance pumps. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 4, 237–245.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544.
- Converse, S. E., Mougous, J. D., Leavell, M. D., Leary, J. A., Bertozzi, C. R., and Cox, J. S. (2003). MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6121–6126.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J. Bacteriol.* 184, 3027–3033.
- Cox, J. S., Chen, B., Mcneil, M., and Jacobs, W. R. Jr. (1999). Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402, 79–83.
- da Silva, P. E., Von Groll, A., Martin, A., and Palomino, J. C. (2011). Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63, 1–9.
- Davies, J. E. (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found. Symp.* 207, 15–27.
- Davin-Regli, A., Bolla, J. M., James, C. E., Lavigne, J. P., Chevalier, J., Garnotel, E., et al. (2008). Membrane permeability and regulation of drug “influx and efflux” in enterobacterial pathogens. *Curr. Drug Targets* 9, 750–759.
- Deng, X., Sun, F., Ji, Q., Liang, H., Missiakas, D., Lan, L., et al. (2012). Expression of multidrug resistance efflux pump gene *norA* is iron responsive in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 194, 1753–1762.
- De Rossi, E., Ainsa, J. A., and Riccardi, G. (2006). Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 36–52.
- Dieppl, G., Ducret, V., Caille, O., and Perron, K. (2012). The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 7:e38148. doi: 10.1371/journal.pone.0038148
- Ding, Y., Onodera, Y., Lee, J. C., and Hooper, D. C. (2008). NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. *J. Bacteriol.* 190, 7123–7129.
- Domenech, P., Reed, M. B., and Barry, C. E. III (2005). Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect. Immun.* 73, 3492–3501.
- Domenech, P., Reed, M. B., Dowd, C. S., Manca, C., Kaplan, G., and Barry, C. E. III (2004). The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 279, 21257–21265.
- Eastgate, J. (2000). *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease. *Mol. Plant Pathol.* 1, 325–329.
- Eda, S., Mitsui, H., and Minamisawa, K. (2011). Involvement of the smeAB multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2855–2862.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., and Ramos, J. L. (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* 182, 2363–2369.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., and Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180, 5443–5447.
- Fajardo, A., Linares, J. F., and Martinez, J. L. (2009). Towards an ecological approach to antibiotics and antibiotic

- resistance genes. *Clin. Microbiol. Infect.* 15(Suppl. 1), 14–16.
- Fargier, E., Mac Aogáin, M., Mooij, M. J., Woods, D. F., Morrissey, J. P., Dobson, A. D. W., et al. (2012). MexT functions as a redox-responsive regulator modulating disulfide stress resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 194, 3502–3511.
- Franke, S., Grass, G., and Nies, D. H. (2001). The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology* 147, 965–972.
- Gonzalez-Pasayo, R., and Martinez-Romero, E. (2000). Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 572–577.
- Grass, G., and Rensing, C. (2001). Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 2145–2147.
- Grkovic, S., Brown, M. H., and Skurray, R. A. (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 671–701.
- Haas, D. (2006). Cost of cell–cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: why it can pay to be signal-blind. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 562.
- Hernandez, A., Mate, M. J., Sanchez-Diaz, P. C., Romero, A., Rojo, F., and Martinez, J. L. (2009). Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *J. Biol. Chem.* 284, 14428–14438.
- Hernandez, A., Ruiz, F. M., Romero, A., and Martinez, J. L. (2011a). The binding of triclosan to SmeT, the repressor of the multidrug efflux pump SmeDEF, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS Pathog.* 7:e1002103. doi: 10.1371/journal.ppat.1002103
- Hernandez, A., Sanchez, M. B., and Martinez, J. L. (2011b). Quinolone resistance: much more than predicted. *Front. Microbiol.* 2:22. doi: 10.3389/fmicb.2011.00022
- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., et al. (2002). Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* 196, 109–118.
- Hirata, K., Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Muraoka, H., Saito, Y., et al. (2010). Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25(Suppl. 1), S75–S79.
- Hofmann, A. F., and Eckmann, L. (2006). How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4333–4334.
- Ingavale, S., Van Wamel, W., Luong, T. T., Lee, C. Y., and Cheung, A. L. (2005). Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 73, 1423–1431.
- Ingavale, S. S., Van Wamel, W., and Cheung, A. L. (2003). Characterization of RAT, an autolysis regulator in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 48, 1451–1466.
- Jain, M., and Cox, J. S. (2005). Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 1:e2. doi: 10.1371/journal.ppat.0010002
- Jerse, A. E., Sharma, N. D., Simms, A. N., Crow, E. T., Snyder, L. A., and Shafer, W. M. (2003). A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect. Immun.* 71, 5576–5582.
- Johnson, P. J., Stringer, V. A., and Shafer, W. M. (2011). Off-target gene regulation mediated by transcriptional repressors of antimicrobial efflux pump genes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2559–2565.
- Kitaoka, M., Miyata, S. T., Unterwieser, D., and Pukatzki, S. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 60, 397–407.
- Kohler, T., Epp, S. F., Curty, L. K., and Pechere, J. C. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181, 6300–6305.
- Kohler, T., Van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M., and Pechere, J. C. (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183, 5213–5222.
- Koronakis, V., Eswaran, J., and Hughes, C. (2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 467–489.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919.
- Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 763–768.
- Kutschke, A., and de Jonge, B. L. (2005). Compound efflux in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3009–3010.
- Lamichane, G., Tyagi, S., and Bishai, W. R. (2005). Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lungs. *Infect. Immun.* 73, 2533–2540.
- Lee, E. H., and Shafer, W. M. (1999). The farAB-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. *Mol. Microbiol.* 33, 839–845.
- Lertpiriyapong, K., Gamazon, E. R., Feng, Y., Park, D. S., Pang, J., Botka, G., et al. (2012). *Campylobacter jejuni* type VI secretion system: roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and in vivo colonization. *PLoS ONE* 7:e42842. doi: 10.1371/journal.pone.0042842
- Li, X. Z., and Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64, 159–204.
- Li, X. Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69, 1555–1623.
- Lin, J., Akiba, M., Sahin, O., and Zhang, Q. (2005a). CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1067–1075.
- Lin, J., Cagliero, C., Guo, B., Barton, Y. W., Maurel, M. C., Payot, S., et al. (2005b). Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 187, 7417–7424.
- Linares, J. F., Lopez, J. A., Camafeita, E., Albar, J. P., Rojo, F., and Martinez, J. L. (2005). Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 1384–1391.
- Linares, J. F., Moreno, R., Fajardo, A., Martinez-Solano, L., Escalante, R., Rojo, F., et al. (2010). The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 12, 3196–3212.
- Lindemann, A., Koch, M., Pessi, G., Muller, A. J., Balsiger, S., Hennecke, H., et al. (2010). Host-specific symbiotic requirement of BdeAB, a RegR-controlled RND-type efflux system in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 312, 184–191.
- Liu, Z. Q., Zheng, P. Y., and Yang, P. C. (2008). Efflux pump gene hefA of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World J. Gastroenterol.* 14, 5217–5222.
- Loake, G., and Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 466–472.
- Lubelski, J., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (2007). Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 463–476.
- Luong, T. T., Dunman, P. M., Murphy, E., Projan, S. J., and Lee, C. Y. (2006). Transcription profiling of the mgrA regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188, 1899–1910.
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., and Hearst, J. E. (1996). The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* 19, 101–112.
- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., and Hearst, J. E. (1995). Genes acrA and acrB encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16, 45–55.
- Maggiorani Valecillos, A., Rodriguez Palenzuela, P., and Lopez-Solanilla, E. (2006). The role of several multidrug resistance systems in *Erwinia chrysanthemi* pathogenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 607–613.
- Martin, R. G., Bartlett, E. S., Rosner, J. L., and Wall, M. E. (2008). Activation of the *Escherichia coli* marA/soxS/rob regulon in response to transcriptional activator concentration. *J. Mol. Biol.* 380, 278–284.
- Martinez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321, 365–367.
- Martinez, J. L. (2009a). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902.
- Martinez, J. L. (2009b). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 276, 2521–2530.
- Martinez, J. L., and Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 647–679.
- Martinez, J. L., Baquero, F., and Andersson, D. I. (2007). Predicting antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 958–965.
- Martinez, J. L., Baquero, F., and Andersson, D. I. (2011). Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 439–445.
- Martinez, J. L., Delgado-Iribarren, A., and Baquero, F. (1990). Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 6, 45–56.

- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martinez-Solano, L., et al. (2009a). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 44–65.
- Martinez, J. L., Sanchez, M. B., Martinez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., et al. (2009b). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 430–449.
- Martinez, J. L., and Rojo, F. (2011). Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 768–789.
- Matilla, M. A., Espinosa-Urgel, M., Rodriguez-Herva, J. J., Ramos, J. L., and Ramos-Gonzalez, M. I. (2007). Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* 8, R179.
- Mcknight, S. L., Iglewski, B. H., and Pesci, E. C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 2702–2708.
- Mercante, A. D., Jackson, L., Johnson, P. J., Stringer, V. A., Dyer, D. W., and Shafer, W. M. (2012). MpeR regulates the mtr efflux locus in *Neisseria gonorrhoeae* and modulates antimicrobial resistance by an iron-responsive mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1491–1501.
- Meyer-Rosberg, K., Scott, D. R., Rex, D., Melchers, K., and Sachs, G. (1996). The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 111, 886–900.
- Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1999). Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 415–417.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443, 173–179.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2011). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587–593.
- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2011). Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* 480, 565–569.
- Neyfakh, A. A. (1997). Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* 5, 309–313.
- Neyrolles, O., and Guilhot, C. (2011). Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* 91, 187–195.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339.
- Nikaido, E., Yamaguchi, A., and Nishino, K. (2008). AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J. Biol. Chem.* 283, 24245–24253.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 119–146.
- Nikaido, H. (2011). Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 77, 1–60.
- Nikaido, H., and Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 769–781.
- Olivares, J., Alvarez-Ortega, C., Linares, J. F., Rojo, F., Kohler, T., and Martinez, J. L. (2012). Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environ. Microbiol.* 14, 1968–1981.
- Palumbo, J. D., Kado, C. I., and Phillips, D. A. (1998). An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J. Bacteriol.* 180, 3107–3113.
- Pantel, K., Dietz, P., Haas, R., and Beier, D. (2003). Two-component systems of *Helicobacter pylori* contribute to virulence in a mouse infection model. *Infect. Immun.* 71, 5381–5385.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., and Saier, M. H. Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1–34.
- Pasca, M. R., Guglielme, P., De Rossi, E., Zara, F., and Riccardi, G. (2005). mmpL7 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4775–4777.
- Paulsen, I. T. (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 446–451.
- Paulsen, I. T., Chen, J., Nelson, K. E., and Saier, M. H. Jr. (2001). Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 145–150.
- Pearson, J. P., Van Delden, C., and Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181, 1203–1210.
- Perez, A., Poza, M., Aranda, J., Latasa, C., Medrano, F. J., Tomas, M., et al. (2012). Effect of the transcriptional activators SoxS, RobA and RamA on expression of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6256–6266.
- Piddock, L. J. (2006a). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 382–402.
- Piddock, L. J. (2006b). Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 629–636.
- Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Mammeri, H., Liard, A., and Nordmann, P. (2005). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3523–3525.
- Poole, K. (2004). “Efflux pumps,” in *Pseudomonas*, ed. J.-L. Ramos (New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher), 636–641.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 20–51.
- Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* 39, 162–176.
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., et al. (1996). Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21, 713–724.
- Pumbwe, L., Skilbeck, C. A., Nakano, V., Avila-Campos, M. J., Piazza, R. M., and Wexler, H. M. (2007). Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microb. Pathog.* 43, 78–87.
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M. T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M. I., Rojas, A., et al. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 743–768.
- Ravirala, R. S., Barabote, R. D., Wheeler, D. M., Reverchon, S., Tatum, O., Malouf, J., et al. (2007). Efflux pump gene expression in *Erwinia chrysanthemi* is induced by exposure to phenolic acids. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 313–320.
- Reidl, J., and Klose, K. E. (2002). *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 125–139.
- Rektorschek, M., Weeks, D., Sachs, G., and Melchers, K. (1998). Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 115, 628–641.
- Rosenberg, E. Y., Bertenthal, D., Nilles, M. L., Bertrand, K. P., and Nikaido, H. (2003). Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol. Microbiol.* 48, 1609–1619.
- Ruiz-Diez, B., Sanchez, P., Baquero, F., Martinez, J. L., and Navas, A. (2003). Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans*–*Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis model. *J. Theor. Biol.* 225, 469–476.
- Ruiz-Palacios, G. M. (2007). The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clin. Infect. Dis.* 44, 701–703.
- Saier, M. H. Jr., and Paulsen, I. T. (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 205–213.
- Saier, M. H. Jr., Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Pao, S. S., Skurray, R. A., and Nikaido, H. (1998). Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* 12, 265–274.
- Sanchez, P., Alonso, A., and Martinez, J. L. (2002a). Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3386–3393.
- Sanchez, P., Linares, J. F., Ruiz-Diez, B., Campanario, E., Navas, A., Baquero, F., et al. (2002b). Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 657–664.
- Sanchez, P., Rojo, F., and Martinez, J. L. (2002c). Transcriptional regulation of mexR, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa* mexAB-oprM multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 63–68.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T., and Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185, 2066–2079.
- Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003). Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, mexHI-opmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant.

- Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2990–2992.
- Shafer, W. M., Qu, X., Waring, A. J., and Lehrer, R. I. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1829–1833.
- Shao, C., Zhang, Q., Sun, Y., Liu, Z., Zeng, J., Zhou, Y., et al. (2008). *Helicobacter pylori* protein response to human bile stress. *J. Med. Microbiol.* 57, 151–158.
- Stahler, F. N., Odenbreit, S., Haas, R., Wilrich, J., Van Vliet, A. H., Kusters, J. G., et al. (2006). The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. *Infect. Immun.* 74, 3845–3852.
- Stone, T. W., Forrest, C. M., Stoy, N., and Darlington, L. G. (2012). Involvement of kynurenines in Huntington's disease and stroke-induced brain damage. *J. Neural. Transm.* 119, 261–274.
- Stoof, J., Belzer, C., and Van Vliet, A. H. M. (2008). "Metal metabolism and transport in *Helicobacter pylori*," in *Helicobacter pylori: Molecular Genetics and Cellular Biology*, ed. Y. Yamaoka (Norfolk: Caister Academic Press), 165–177.
- Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D. B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., et al. (2012). SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1797–1809.
- Taylor, D. L., Bina, X. R., and Bina, J. E. (2012). *Vibrio cholerae* VexH encodes a multiple drug efflux pump that contributes to the production of cholera toxin and the toxin co-regulated pilus. *PLoS ONE* 7:e38208. doi: 10.1371/journal.pone.0038208
- Teran, W., Felipe, A., Segura, A., Rojas, A., Ramos, J. L., and Gallegos, M. T. (2003). Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3067–3072.
- Tian, Z. X., Fargier, E., Mac Aogain, M., Adams, C., Wang, Y. P., and O'Gara, F. (2009a). Transcriptome profiling defines a novel regulon modulated by the LysR-type transcriptional regulator MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 37, 7546–7559.
- Tian, Z. X., Mac Aogain, M., O'Connor, H. E., Fargier, E., Mooij, M. J., Adams, C., et al. (2009b). MexT modulates virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* independent of the MexEF-OprN efflux pump. *Microb. Pathog.* 47, 237–241.
- Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., et al. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539–547.
- Trainor, E. A., Horton, K. E., Savage, P. B., Testerman, T. L., and Mcgee, D. J. (2011). Role of the HefC efflux pump in *Helicobacter pylori* cholesterol-dependent resistance to ceragenins and bile salts. *Infect. Immun.* 79, 88–97.
- Trotonda, M. P., Tamber, S., Memmi, G., and Cheung, A. L. (2008). MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 76, 5645–5654.
- Truong-Bolduc, Q. C., Dunman, P. M., Strahilevitz, J., Projan, S. J., and Hooper, D. C. (2005). MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 2395–2405.
- Truong-Bolduc, Q. C., Zhang, X., and Hooper, D. C. (2003). Characterization of NorR protein, a multifunctional regulator of norA expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 185, 3127–3138.
- Tsugawa, H., Suzuki, H., Muraoka, H., Ikeda, F., Hirata, K., Matsuzaki, J., et al. (2011). Enhanced bacterial efflux system is the first step to the development of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 656–660.
- Tullius, M. V., Harmston, C. A., Owens, C. P., Chim, N., Morse, R. P., Mcmath, L. M., et al. (2011). Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5051–5056.
- van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., Waidner, B., Davies, B. J., De Vries, N., Penn, C. W., et al. (2001). Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect. Immun.* 69, 4891–4897.
- Veal, W. L., Nicholas, R. A., and Shafer, W. M. (2002). Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an mtrR mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 184, 5619–5624.
- Vila, J., and Martinez, J. L. (2008). Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Curr. Drug Targets* 9, 797–807.
- Waidner, B., Melchers, K., Ivanov, I., Loferer, H., Bensch, K. W., Kist, M., et al. (2002). Identification by RNA profiling and mutational analysis of the novel copper resistance determinants CrdA (HP1326), CrdB (HP1327), and CzcB (HP1328) in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 184, 6700–6708.
- Waidner, B., Melchers, K., Stahler, F. N., Kist, M., and Bereswill, S. (2005). The *Helicobacter pylori* CrdRS two-component regulation system (HP1364/HP1365) is required for copper-mediated induction of the copper resistance determinant CrdA. *J. Bacteriol.* 187, 4683–4688.
- Warner, D. M., Folster, J. P., Shafer, W. M., and Jerse, A. E. (2007). Regulation of the MtrC-MtrD-MtrE efflux-pump system modulates the in vivo fitness of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Infect. Dis.* 196, 1804–1812.
- Webb, V., and Davies, J. (1993). Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes? *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2379–2384.
- Webber, M. A., and Piddock, L. J. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 9–11.
- Worku, M. L., Karim, Q. N., Spencer, J., and Sidebotham, R. L. (2004). Chemotactic response of *Helicobacter pylori* to human plasma and bile. *J. Med. Microbiol.* 53, 807–811.
- Wu, C. P., Hsieh, C. H., and Wu, Y. S. (2011). The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Mol. Pharm.* 8, 1996–2011.
- Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2005). Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.* 56, 215–227.
- Zhang, A., Rosner, J. L., and Martin, R. G. (2008). Transcriptional activation by MarA, SoxS and Rob of two tolC promoters using one binding site: a complex promoter configuration for tolC in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 69, 1450–1455.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 13 November 2012; paper pending published: 04 December 2012; accepted: 07 January 2013; published online: 05 February 2013.

Citation: Alvarez-Ortega C, Olivares J and Martínez JL (2013) RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front. Microbio.* 4:7. doi: 10.3389/fmicb.2013.00007

This article was submitted to *Frontiers in Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, a specialty of *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2013 Alvarez-Ortega, Olivares and Martínez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.





# Characterization of the Polymyxin B Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*

Lucía Fernández,<sup>a</sup> Carolina Álvarez-Ortega,<sup>b</sup> Irith Wiegand,<sup>a\*</sup> Jorge Olivares,<sup>b</sup> Dana Kocincová,<sup>c</sup> Joseph S. Lam,<sup>c</sup> José Luis Martínez,<sup>b</sup> Robert E. W. Hancock<sup>a</sup>

Centre for Microbial Diseases and Immunity Research, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada<sup>a</sup>; Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, and CIBERESP, Madrid, Spain<sup>b</sup>; Department of Molecular and Cellular Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada<sup>c</sup>

**Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is increasingly becoming a threat for human health. Indeed, some strains are resistant to almost all currently available antibiotics, leaving very limited choices for antimicrobial therapy. In many such cases, polymyxins are the only available option, although as their utilization increases so does the isolation of resistant strains. In this study, we screened a comprehensive PA14 mutant library to identify genes involved in changes of susceptibility to polymyxin B in *P. aeruginosa*. Surprisingly, our screening revealed that the polymyxin B resistome of this microorganism is fairly small. Thus, only one resistant mutant and 17 different susceptibility/intrinsic resistance determinants were identified. Among the susceptible mutants, a significant number carried transposon insertions in lipopolysaccharide (LPS)-related genes. LPS analysis revealed that four of these mutants (*galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg*) had an altered banding profile in SDS-polyacrylamide gels and Western blots, with three of them exhibiting LPS core truncation and lack of O-antigen decoration. Further characterization of these four mutants showed that their increased susceptibility to polymyxin B was partly due to increased basal outer membrane permeability. Additionally, these mutants also lacked the aminoarabinose-substituted lipid A species observed in the wild type upon growth in low magnesium. Overall, our results emphasize the importance of LPS integrity and lipid A modification in resistance to polymyxins in *P. aeruginosa*, highlighting the relevance of characterizing the genes that affect biosynthesis of cell surface structures in this pathogen to follow the evolution of peptide resistance in the clinic.**

*Pseudomonas aeruginosa* is a prominent nosocomial pathogen, as well as a major cause of chronic infections in cystic fibrosis patients (1–3). This microorganism is notably resistant to most antibiotics available in the market (hence its designation as a “superbug”). Indeed, the number of antimicrobials that can be used to treat *Pseudomonas* infections, particularly those caused by multiresistant strains, is quite limited (4). For this reason, there has been resurgence in the use of polymyxins (5), lipopeptides of bacterial origin, of which polymyxin B and colistin (polymyxin E) are the best-known representatives. The mechanism of action of polymyxins involves an initial stage of interaction with the lipid A of lipopolysaccharide (LPS) leading to self-promoted uptake across this membrane followed by cell death by mechanisms that have not been well defined (6). Even though polymyxins were discovered in the 1940s, their use since the mid-1980s has been restricted to topical applications due to concerns regarding their toxicity, although new manufacturing methods and the use of methane sulfonate derivatives as prodrugs seem to have alleviated some of these issues. Nevertheless, a legitimate concern about more intensive use of this class of drugs is the development of resistance by bacteria.

To date, the incidence of polymyxin-resistant microorganisms in the clinic is relatively low. However, the increased use of these antibiotics for the treatment of multiresistant strains has led to a greater frequency of resistant clinical isolates (7). In the case of *Pseudomonas*, a growing number of clinical strains display resistance to polymyxins due to mutations in the two-component systems PhoPQ, PmrAB, or ParRS (8–10). These mutations result in the constitutive expression of the LPS modification (*arn*) operon, which encodes the proteins necessary for the aminoarabinylation of the lipid A moiety of LPS. This modification reduces the negative charge of the cell surface, thereby limiting its interaction with the positively charged polymyxins and consequent self-promoted uptake.

This is the most common mechanism of adaptive resistance to antimicrobial peptides observed in many Gram-negative bacteria. In *P. aeruginosa*, this modification is triggered under low-Mg<sup>2+</sup> conditions and upon exposure to subinhibitory concentrations of certain antimicrobial peptides in a process that involves several two-component systems, including those mentioned above (11–13). Despite recent advances in the understanding of peptide adaptive resistance in this pathogen, our knowledge of intrinsic and mutationally driven resistance of *P. aeruginosa* to polymyxins is somewhat limited.

Recently, screening of transposon mutant libraries has permitted the mapping of many of the genes that constitute the resistome of *P. aeruginosa* to different types of antimicrobials, including  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and fluoroquinolones (14–19). These comprehensive studies revealed that the genetic determinants of antibiotic resistance in this pathogen are far more complex than originally thought. Thus, in addition to traditional resistance mechanisms, such as porins and efflux pumps, genes encoding proteins with functions related to metabolism, transcriptional regulation, or motility were identified. Also of note, these studies reported the identification of numerous genes that conferred low-level resistance upon mutation. This is of particular interest as the accumulation of low-level-impact mutations is

Received 1 August 2012 Accepted 8 October 2012

Published ahead of print 15 October 2012

Address correspondence to Robert E. W. Hancock, bob@hancocklab.com.

\* Present address: Irith Wiegand, AiCuri GmbH and Co. KG, Wuppertal, Germany.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01583-12

thought to eventually lead to breakthrough clinical resistance in a stepwise manner (20). In this study, we carried out a high-throughput screening of the Harvard transposon mutant library (21) of *P. aeruginosa* strain PA14, with the aim of identifying genes that participate in the polymyxin resistance of this microorganism. Surprisingly, a relatively modest resistome with respect to this cationic peptide antibiotic was identified.

## MATERIALS AND METHODS

**Growth conditions and antimicrobials.** Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar at 37°C. Mueller-Hinton medium and the defined medium BM2-glucose [62 mM potassium phosphate buffer (pH 7), 7 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 μM FeSO<sub>4</sub>, 0.4% (wt/vol) glucose] containing a high (2 mM) or low (20 μM) MgSO<sub>4</sub> concentration were used for all experiments concerning antibiotic susceptibility determinations. When required for plasmid or mutant maintenance in *P. aeruginosa*, gentamicin, chloramphenicol, or carbenicillin was supplemented to each growth medium at 15 μg/ml, 200 μg/ml, and 500 μg/ml, respectively. Chloramphenicol was supplemented at a concentration of 30 μg/ml for selection in *Escherichia coli*. All antibiotics were purchased from Sigma. The cationic peptides CP28, indolicidin, and LL37 were synthesized by 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) methods at either the Brain Research Center (University of British Columbia, Vancouver, Canada) or GenScript (Piscataway, NJ) and were 95% pure as determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS).

**Identification and confirmation of transposon mutants with altered susceptibility to polymyxin B.** The identification of genes that participate in the polymyxin B resistance of *P. aeruginosa* was performed by screening the comprehensive PA14 transposon mutant library (21). Briefly, a total number of 5,850 mutants carrying transposon insertions in 4,596 different genes were analyzed for their increased resistance or susceptibility to polymyxin B with the aim of finding either mutational or intrinsic resistance determinants, respectively. This screening was carried out by using the agar dilution method as previously described (15, 22). Thus, the library was replicated into 96-well plates containing LB and grown overnight at 37°C. The next day, these cultures were diluted and approximately 1 μl from each well was inoculated onto agar plates containing Mueller-Hinton medium supplemented with different concentrations of polymyxin B. Under these conditions, the MIC of the wild-type strain was 0.5 μg/ml. The results were read following 18 h of incubation at 37°C, and those mutants that showed changes in susceptibility of at least 2-fold compared to the wild type were selected for individual analysis. The altered susceptibility phenotype of the mutants was then confirmed by the Etest and/or broth microdilution method. The correct insertion of the transposon in the selected mutants was confirmed by PCR.

**Determination of MICs to different antimicrobial peptides.** Peptide MICs were investigated by broth microdilution in accordance with CLSI guidelines by utilizing BM2-glucose medium with a high (2 mM) concentration of Mg<sup>2+</sup> (23). The MIC determination assays were performed in polypropylene microtiter plates to avoid binding of the peptides to polystyrene, which could lead to artificially high MIC values (23). The MIC plates were incubated at 37°C for 24 h, after which the concentration with no visible bacterial growth was considered the MIC.

**RT-qPCR.** RNA was purified from cultures of *P. aeruginosa* PA14 wild-type or mutant strains grown to mid-logarithmic phase (optical density at 600 nm [OD<sub>600</sub>] of 0.4 to 0.6) in BM2-glucose medium under different conditions, namely, with a high (2 mM) or low (20 μM) Mg<sup>2+</sup> concentration and with or without a subinhibitory concentration (0.25 μg/ml) of polymyxin B. Additionally, aliquots taken from the wild-type cultures grown with a high Mg<sup>2+</sup> concentration without antibiotic were subsequently challenged with a lethal dose (2 μg/ml) of polymyxin B. RNA was prepared and reverse transcribed into cDNA by using reverse transcriptase (RT) as previously described (24). The quantitative PCRs (qPCRs) were performed in an ABI Prism 7000 instrument (Applied Biosystems, Foster, CA), and the mixtures contained 2.5 μl from a 1:100

dilution of cDNA as a template and SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems). The *rpsL* gene was used as a housekeeping gene for the calculation of the fold changes according to the threshold cycle (*C<sub>T</sub>*) method. For each condition, RNA was prepared from three independent cultures, and each one was assayed in duplicate.

**Analysis of LPS and lipid A.** LPS from whole-cell lysates was prepared following the method of Hitchcock and Brown (25) and subsequently analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining according to the modified protocol of Fomsgaard et al. (26). Lipid A isolation was performed from 50-ml cultures of *P. aeruginosa* strains grown in low (20 μM) Mg<sup>2+</sup>–BM2-glucose to an OD<sub>600</sub> of 0.7. Purification was by the protocol described by Zhou et al. (27), and lipid A was then kept at 4°C until its analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) with an ABI Voyager DE-STR spectrometer in the reflectron mode at the University of British Columbia facilities.

**Dansyl-polymyxin binding experiments.** Dansyl-polymyxin assays were performed using whole cells as previously described (28). Briefly, cultures of the different strains were grown in BM2 minimal medium to mid-logarithmic phase and then washed twice with 5 mM HEPES (pH 7.2) supplemented with 5 mM sodium azide to inhibit energization. Cells were resuspended in the same buffer at an OD<sub>600</sub> of 0.5. Two milliliters from each bacterial suspension was placed in a quartz cuvette, and aliquots of dansyl-polymyxin were gradually added. The emission of fluorescence was measured at 485 nm following excitation at 340 nm in a Perkin-Elmer LS-50B spectrophotometer.

**Outer membrane permeability assays.** To compare the outer membrane permeabilities of different mutant strains to that of the wild type, the 1-*N*-phenyl-naphthylamine (NPN) assay was performed as described by Loh et al. (29). Briefly, overnight cultures of the different strains were subcultured into BM2 medium and grown to mid-logarithmic phase. These cells were harvested, washed with 5 mM sodium HEPES buffer (pH 7.2), and then resuspended at a final OD<sub>600</sub> of 0.5 in the same buffer supplemented with a 5 μM concentration of the uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). NPN was then added at a final concentration of 15 μM to 2-ml cell suspensions. Fluorescence was monitored by using a Perkin-Elmer LS-50B spectrophotometer at excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively.

**Complementation of the *galU* (PA2023), *lptC* (PA4459), and *ssg* (PA5001) mutants.** Each gene was amplified by PCR using genomic DNA from the PA14 wild-type strain as a template. The primers used were designed with program Primer3 (30) from the genomic sequence of *P. aeruginosa* PA14 (31) and were as follows: COMP<sub>galU</sub>-F, TCATCTACCAGGGCATAG GAC; COMP<sub>galU</sub>-R, CGACAGCTCGGGTAGAGC; COMPl<sub>lptC</sub>-F, GGC TATGAGCAAGTCGCCTA; COMPl<sub>lptC</sub>-R, CCTGCTTGTCGTCCAG TTC; COMP<sub>ssg</sub>-F, CGTGATGCTTGGGTTCGAG; and COMP<sub>ssg</sub>-R, CTT CACGTCCCCATTCAAAG. The fragments resulting from PCR were cloned into the Zero-Blunt TOPO vector (Invitrogen) and then cut with NsiI. The NsiI fragments were then ligated into the PstI site of the broad-host-range vector pBBR1MCS, which has a chloramphenicol selection marker (32). Thus, the plasmids pBBR1MCS-*galU*, pBBR1MCS-*lptC*, and pBBR1MCS-*ssg* were generated and subsequently transformed into the respective mutants in order to obtain the complemented strains (designated the *CgalU*, *ClptC*, and *Cssg* strains).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Identification of mutants with altered polymyxin B susceptibility phenotypes.** Screening of the transposon mutant library for mutations that confer increased resistance or susceptibility to polymyxin B led to the identification of 18 mutant strains (Table 1). Of these genes, 17 were deemed intrinsic resistance determinants and conferred a supersusceptible phenotype upon mutation. Only one of these mutants, which harbors the well-known *phoQ* mutation (12), was involved in increased, mutational resistance. Overall, this was a remarkably small number of genes in

TABLE 1 Mutants identified in the screening and changes in susceptibility to different cationic antimicrobial peptides

PAO1 ortholog	Gene name and/or description	Fold change in susceptibility of mutant compared to that of wild-type PA14 as determined by <sup>a</sup> :	Broth microdilution				
			Etest (PxB)	PxB	COL	CP28	IND
PA0401	Noncatalytic dihydroorotase-like protein	−1.5	—	—	—	—	—
PA0402	<i>pyrB</i> ; aspartate carbamoyltransferase	−3.0	—	—	—	—	—
PA1180	<i>phoQ</i> ; two-component sensor protein	+4.0	> +8	> +8	NC	NC	+2
PA1375	<i>pdxB</i> ; erythronate-4-phosphate dehydrogenase	−1.5	—	—	—	—	—
PA1588	<i>sucC</i> ; succinyl-coenzyme A synthetase beta chain	−1.5	−2	−2	−2	NC	−2
PA1799	<i>parR</i> ; two-component response regulator	—	−2	−2	NC	NC	NC
PA2023	<i>galU</i> ; UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	−2.0	−2	−2	−4	−2	−4
PA3050	<i>pyrD</i> ; dihydroorotate dehydrogenase	−1.5	—	—	—	—	—
PA4020	<i>mpl</i>	−1.5	—	—	—	—	—
PA4069	Hypothetical protein, ( <i>rmlD</i> homolog)	−1.5	−2	−2	−2	NC	NC
PA4109	<i>ampR</i> ; transcriptional regulator	—	−2	−2	−2	NC	−2
PA4459	<i>lptC</i> ; conserved hypothetical protein	−3.0	−4	−4	−2	−8	−8
PA4748	<i>tpiA</i> ; triosephosphate isomerase	−1.5	—	—	—	—	—
PA4776	<i>pmrA</i> ; two-component response regulator	—	−2	−2	−2	NC	−2
PA5000	<i>wapR</i> ; putative glycosyl transferase	−3.0	−2	−2	−2	NC	−4
PA5001	<i>ssg</i> ; conserved hypothetical protein	−3.0	−2	−2	−2	−4	−4
PA5038	<i>aroB</i> ; 3-dihydrokinate synthase	−3.0	—	—	—	—	—
PA5199	<i>amgS</i> ; two-component sensor protein	−1.5	−2	−2	NC	NC	NC

<sup>a</sup> Fold changes were calculated based on the modal MICs calculated for each strain. PxB, polymyxin B; COL, colistin; IND, indolicidin; —, not tested; NC, no change observed.

comparison with the results obtained in other screenings performed with antibiotics from other classes, such as  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and fluoroquinolones, which identified a considerably larger number and diversity of genes (14, 15, 17, 19). Although these results seem to indicate that the mechanisms involved in resistance to polymyxins are quite limited, it must be taken into account that transposon mutant library screenings are limited to the analysis of nonessential genes. Thus, it is possible that some of the genes that participate in intrinsic or mutation-derived resistance to polymyxins play essential roles and would therefore be missed in this screening.

As mentioned, only the *phoQ* mutant displayed a greater (4- to 8-fold-increased) level of resistance than the wild-type PA14. This is strikingly different from results of other screenings such as those carried out with  $\beta$ -lactams (14), ciprofloxacin (15), and tobramycin (19), which found 41, 79, and 135 mutants, respectively, with decreased susceptibility. Furthermore, a high proportion of the resistant mutants described in those studies displayed low-level resistance, which is considered the driving force of stepwise increase in resistance (20, 33), while no such mutations were identified in the screening for polymyxin resistance. At first glance, this might imply that mutational resistance to polymyxins would be extremely rare in the clinic. However, there is evidence that gain-of-function mutations affecting the activation of the response regulators PmrA, PhoP, and ParR can, like the *phoQ* mutation (34), result in constitutive expression of the LPS modification (*arn*) operon and, consequently, in increased peptide resistance (10, 35). These results, therefore, emphasized the importance of understanding the regulatory pathways involved in adaptive resistance to antimicrobial peptides in this microbe, as alterations in the regulation of these adaptations appear to provide the major background for polymyxin clinical resistance.

Among the genes that are disrupted in the 18 polymyxin-resistant mutants, five encode proteins with a regulatory function

(Table 1). Three are the aforementioned *parR*, *pmrA*, and *phoQ*, all of which play key roles in adaptive peptide resistance by regulating the expression of the LPS modification operon. Presumably, the mutations in *parR* or *pmrA* led to a slight increase in susceptibility by limiting the acquisition of adaptive resistance upon exposure to polymyxin B, as shown previously (11). Additionally, mutants with mutations in the genes encoding AmpR and the two-component sensor protein AgmS were also more susceptible to polymyxin B than the wild-type strain.

The screening also identified genes predicted to encode proteins that participate in metabolism, including PA0401, *pyrB*, *pdxB*, *sucC*, *tpiA*, and *aroB*. Although many of these mutants (except the *sucC* mutant) exhibited lower growth rates, other growth-defective mutants were not identified in the screen, and it should be noted that metabolism-related genes have been consistently identified in all comprehensive screenings for determinants of resistance against other antibiotics in *P. aeruginosa* (14, 15, 17, 19), as well as being involved in biofilm formation and swarming motility, which lead to multiresistant states (20). Consequently, we hypothesize that metabolic pathways that are affected in these mutants are likely to play a role in the ability of *P. aeruginosa* to withstand antibiotic and particularly polymyxin challenges.

**Effects of specific LPS mutations.** Significantly, five of the 17 supersusceptible mutants contained insertions in genes predicted to be involved in the synthesis and transport of LPS. For example, the protein GalU is a UDP-glucose pyrophosphorylase that participates in the synthesis of UDP-D-glucose, which is the precursor of different cell surface structures. Significantly, D-glucose is the most abundant sugar in the outer core oligosaccharide of LPS (36, 37). The involvement of *galU* in polymyxin resistance has already been observed in other species such as *Campylobacter jejuni* (38), *Proteus mirabilis* (39), and *Yersinia pestis* (40). The product of PA5000, WapR, is a rhamnosyltransferase implicated in the synthesis of the capped core oligosaccharide, which is covalently



linked to long-chain O polysaccharides of LPS (41, 42). Another gene related to the synthesis of the LPS core is PA5001, encoding a putative glycosyltransferase that, like *wapR*, is located in the LPS core biosynthesis cluster (42). PA5001 is homologous to the gene *ssg* (cell surface sugar biosynthetic glycosyltransferase) of *Pseudomonas alkylphenolia*, with 79% identity (43). By homology, the *P. aeruginosa* PA5001 gene is designated *ssg* here. PA4459 shares high similarity with the gene encoding LptC of *E. coli*, which is part of the transmembrane machinery necessary for the transport of LPS from the inner membrane to the outer membrane (44). Finally, the product of PA4069 shares 39% similarity with RmlD (PA5162), which is one of the enzymes required for the synthesis of dTDP-L-rhamnose, which is a precursor for the L-rhamnose residue that is found in the outer core of *P. aeruginosa* LPS (45). The discovery of these mutants in which the disrupted genes play essential roles in LPS biosynthesis correlated well with the known role of LPS in self-promoted uptake of polymyxin and antimicrobial peptides. It must be noted that the number of LPS-related genes actually involved in polymyxin resistance might be even greater, since many of them are essential for cell survival and growth and, as mentioned above, would not be identified in a mutant screening. However, these data do not *per se* imply that a particular length of LPS core is required for polymyxin susceptibility, since mutants with mutations in the O-antigenic polysaccharide or rough core transferases, which are viable, did not demonstrate polymyxin resistance in our screen.

#### Resistance to other antibiotics and antimicrobial peptides.

Interestingly, there was a significant overlap between the genes identified in our polymyxin B screening and genes involved in  $\beta$ -lactam resistance (14), although the impacts were often opposite. Thus, while the PA0401, *pyrB*, and *pyrD* mutants were more susceptible to  $\beta$ -lactams than the wild type, strains with mutations in *galU*, *ampR*, *lptC*, *aroB*, *wapR*, and *ssg*, in contrast, all displayed decreased susceptibility to  $\beta$ -lactams while being more sensitive to polymyxin B. Further overlaps with comprehensive mutant library screenings include *sucC*, which showed low-level resistance to the aminoglycoside tobramycin (19), as well as *pdxB*, *sucC*, and *lptC*, which were all more susceptible to ciprofloxacin (15). The fact that many of the same genes influence the susceptibility of *Pseudomonas* to different antibiotic classes is interesting as it suggests that certain genes coordinate multidrug resistance possibly by affecting regulatory pathways. Understanding these resistance networks could be the key for the development of novel antimicrobial therapy strategies as well as our understanding of microbial adaptations such as biofilm formation and swarming motility, which lead to broad-spectrum resistance, in susceptibility to antibiotics.

We also determined the MICs of these strains to other cationic antimicrobial peptides, namely, colistin, CP28, indolicidin, and LL37, excluding from this assay 6 strains with defective growth (the *pyrC*, *pyrB*, *pdxB*, *pyrD*, *tpiA*, and *aroB* mutants). All of the tested transposon mutants had altered susceptibility to colistin, and all except the *parR* and *agmS* mutants were additionally altered in susceptibility to one or more antimicrobial peptides (Table 1). The *galU*, *lptC*, and *ssg* mutants were supersusceptible to all peptides tested, whereas the *sucC*, *ampR*, *pmrA*, and *wapR* mutants were less resistant to CP28 and LL37 but not to indolicidin. The PA4069 mutant showed the same level of supersusceptibility to indolicidin and LL37 as the wild type, but it was more susceptible to CP28. The increased resistance displayed by the *phoQ* mu-

TABLE 2 Analysis by RT-qPCR of the dysregulation of the genes identified in the screening by a subinhibitory (0.25- $\mu$ g/ml) or a lethal (2- $\mu$ g/ml) concentration of polymyxin B

PAO1 ortholog	Gene	Fold expression change (mean $\pm$ SD) <sup>a</sup> with polymyxin B concn of:	
		0.25 $\mu$ g/ml (sublethal) <sup>b</sup>	2 $\mu$ g/ml (lethal) <sup>c</sup>
PA0401		0.8 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1
PA1375	<i>pdxB</i>	0.8 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 1.6
PA1558	<i>sucC</i>	1.2 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.5
PA2023	<i>galU</i>	<b>2.0 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>8.0 <math>\pm</math> 1.3</b>
PA3050	<i>pyrD</i>	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2
PA3552 <sup>d</sup>	<i>arnB</i>	<b>4.4 <math>\pm</math> 2.8</b>	<b>16.3 <math>\pm</math> 6.8</b>
PA4020	<i>mpl</i>	1.21 $\pm$ 0.20	1.48 $\pm$ 0.1
PA4069		1.0 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.1
PA4109	<i>ampR</i>	1.4 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1
PA4459	<i>lptC</i>	1.1 $\pm$ 0.2	<b>2.9 <math>\pm</math> 0.4</b>
PA4748	<i>tpiA</i>	0.9 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.3
PA5000	<i>wapR</i>	1.4 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.7
PA4776	<i>pmrA</i>	<b>2.8 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>1.9 <math>\pm</math> 0.1</b>
PA5001	<i>ssg</i>	1.4 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.2
PA5038	<i>aroB</i>	0.8 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2
PA5199	<i>agmS</i>	1.0 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> Boldface indicates that the gene was more than 2-fold dysregulated under the assay conditions.

<sup>b</sup> Cells were grown to mid-log phase in BM2-glucose with a high  $Mg^{2+}$  concentration (2 mM) supplemented with sublethal (0.25  $\mu$ g/ml) polymyxin B; gene expression is described relative to that of no-antibiotic control cells.

<sup>c</sup> Cells were grown to mid-log phase in BM2-glucose with a high  $Mg^{2+}$  concentration (2 mM) and exposed for 30 min to the antibiotic; gene expression is described relative to that of no-antibiotic control cells.

<sup>d</sup> The gene *arnB* (LPS modification operon) was used as a control as it is known to be upregulated by antimicrobial peptides.

tant was almost exclusively to polymyxins, while only a modest 2-fold increase in resistance to the human cathelicidin LL37 was observed. These results suggest that the mutations analyzed in this study differently affected the antimicrobial activity of cationic peptides depending, presumably, on the specific properties of each peptide.

**Gene expression in the presence of polymyxin B.** The dysregulation of resistance determinants is thought to be an important factor in adaptive resistance. Therefore, we set out to determine whether any of the genes identified in this screening are dysregulated when the cells are grown with subinhibitory polymyxin B (0.25  $\mu$ g/ml) or upon exposure to a lethal concentration of polymyxin B (2  $\mu$ g/ml) for 30 min after reaching mid-logarithmic phase (Table 2). As a control, we evaluated the expression of the gene *arnB*, which is part of the LPS modification operon and is known to be upregulated by polymyxin B (11). As expected, *arnB* was induced by both subinhibitory and lethal polymyxin B concentrations (4- and 16-fold, respectively). The *pmrA* gene was also induced by subinhibitory polymyxin B (approximately 3-fold) but only slightly by a lethal treatment (approximately 2-fold). Additionally, we observed a 2-fold and an 8-fold induction of the gene *galU* by sublethal and lethal polymyxin B, respectively, as well as increased transcription of *lptC* (approximately 3-fold) following a challenge with lethal polymyxin B. Expression of *galU* is also induced by polymyxin B in *P. mirabilis* through activation by the response regulator RppA (39).

**Analysis of LPS from selected susceptible mutants.** The polymyxin B-supersusceptible mutants carrying insertions in genes

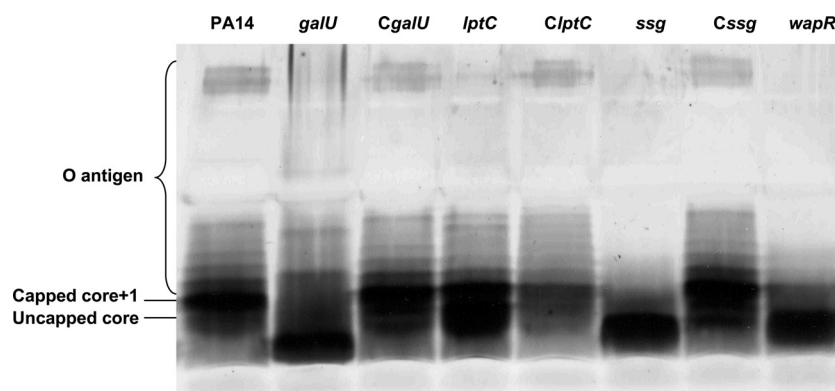


FIG 1 LPS profiles obtained by SDS-PAGE analysis of wild-type strain PA14 and the mutants with mutations in the genes *galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg*, as well as the complemented *CgalU*, *ClptC*, and *Csgg* strains.

related to LPS biosynthesis, as well as other mutants, were further analyzed by SDS-PAGE to observe if they indeed had altered LPS patterns. The identities of the uncapped core and the capped core-plus-one bands were confirmed by Western blotting (data not shown). LPS was prepared from the *amgS*, *mpl*, *ampR*, PA4069, *galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg* mutants and compared to LPS from the PA14 wild-type strain. In such analyses, the most predominant band was the capped core substituted with one unit of O polysaccharide (capped core plus one), in contrast to strain PAO1, in which the most intense band is the fastest-migrating band, which represents the uncapped core. Visible differences were observed for the *galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg* mutants (Fig. 1), whereas the *envZ*, *mpl*, *ampR*, and PA4069 mutants showed no clear differences (data not shown). Three mutants, namely, the *galU*, *wapR*, and *ssg* mutants, demonstrated a prominent leading band with much higher mobility than the uncapped core band, consistent with a truncation in LPS yielding a rough core, and these mutants also lacked slower-migrating bands capped with O polysaccharide (Fig. 1). In contrast, the LPS of the *lptC* mutant was characterized by a greater abundance of uncapped core compared to that in the wild type, but it did not lack O-polysaccharide-capped species (Fig. 1). This was in part consistent with prior studies on *galU* and *wapR* mutants demonstrating a truncated core and lack of O polysaccharide (42, 46, 47). These observations were consistent with the predicted functions of the proteins encoded by these two genes. Thus, in the *galU* mutant, the lipid A-core would lack D-glucose, resulting in a truncated core. Therefore, as stated above, such a core oligosaccharide would not be capped (or substituted) by either O polysaccharide (46). In the case of *wapR*, its product is essential for the addition of the  $\alpha$ -1,3-linked L-rhamnose to which both A- and B-band O-antigen polysaccharides are attached (41, 42). In contrast, no study had previously shown a similar phenotype produced by a mutation in PA5001 in this microorganism. However, the *ssg* mutant of *P. alkylphenolia* has an LPS with a truncated core and without O antigen (43).

To demonstrate that the observed phenotypes were due to the predicted mutations, complementation of three of the LPS-related genes was performed. These genes were cloned in the low-copy vector pBBR1MCS and then transformed into the respective mutant strains. All three complemented strains showed a wild-type LPS banding pattern as visualized in a silver-stained SDS-polyacrylamide gel (Fig. 1). Peptide susceptibility also decreased in the complemented strains

compared to the mutants, although in a few cases, resistance did not reach wild-type levels (Table 3). As a result, we can conclude that the phenotypes displayed by these three mutants were caused by the transposon insertions in the genes *galU*, *lptC*, and *ssg* and were not due to secondary mutations.

Previous studies had reported contradictory results about the link between rough LPS and resistance to cationic compounds, such as aminoglycosides and polymyxins. For example, Yokota and Fujii (48) showed that only deep-rough mutants were more susceptible, while other rough mutants demonstrated normal to decreased susceptibility. Below we describe experiments aimed at understanding the mechanism by which these mutants acquire increased susceptibility. However, as it is the lipid A region of LPS that binds polymyxin, we assume that the lack of O antigen and core truncations were not *per se* responsible for the polymyxin supersusceptibility.

**Dansyl-polymyxin and NPN assays.** Although four of the supersusceptible mutants identified in the screening displayed changes in their LPS patterns compared to that of the wild type, this characteristic does not *per se* explain their increased susceptibility to polymyxins. One possible explanation for their phenotypes could be an increased binding of polymyxin B to the LPS on the cell surface of these strains, leading to enhanced uptake. To investigate this, the binding of dansyl-polymyxin to the LPS and to the cell surface was assessed. However, no significant difference was observed between any of the tested mutants (*galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg*) and the wild type, indicating that this was not the reason for the polymyxin susceptibility observed in these strains (Fig. 2).

Another possibility is that defects in LPS structure increased

TABLE 3 MICs to different peptides of the wild-type PA14, the *galU*, *lptC*, and *ssg* mutants, and their respective complemented strains

Strain	MIC ( $\mu$ g/ml)				
	Polymyxin B	Colistin	CP28	Indolicidin	LL-37
PA14	0.5	1	16	64	64
<i>galU</i>	0.25	0.5	4	16	16
<i>CgalU</i>	0.5	1	8	64	32
<i>lptC</i>	0.125	0.25	8	8	8
<i>ClptC</i>	0.5	1	16	64	16
<i>ssg</i>	0.25	0.5	8	32	16
<i>Csgg</i>	0.5	1	16	64	64

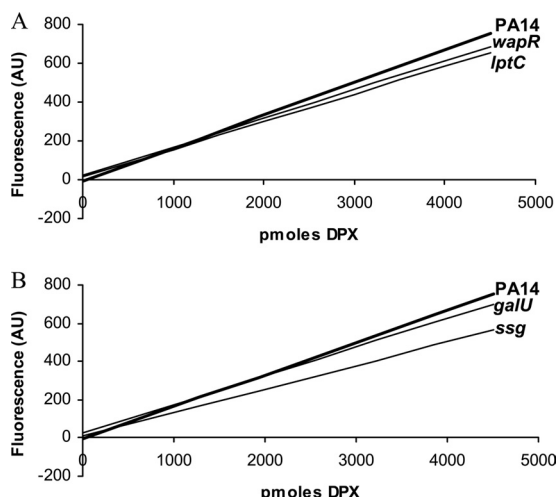


FIG 2 Binding of dansyl-polymyxin (DPX) to whole cells of different *P. aeruginosa* strains. (A) Wild-type PA14 and the *lptC* and *wapR* mutant strains; (B) wild-type PA14 and the *galU* and *ssg* mutant strains. The graphs represent trend lines calculated for each strain. A greater slope indicates greater affinity for dansyl-polymyxin. Previous experiments have demonstrated that dansyl-polymyxin binds principally to LPS in the outer membrane. The results shown correspond to one representative experiment out of three with the same trends. AU, arbitrary units.

the general permeability of the cell envelope, resulting in lower resistance to polymyxins. This can be analyzed by performing an NPN assay, in which the fluorescence emission due to partitioning of the hydrophobic fluorescent probe NPN into the outer mem-

brane gives an indication of outer membrane permeability for the strains of interest. Thus, a greater emission of fluorescence would indicate greater permeability of the outer membrane to NPN. The results of this assay revealed that all four tested mutants, namely, the *galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg* mutants, exhibited greater outer membrane permeability than the wild-type PA14 (Fig. 3). In each case examined, the increased permeability to NPN was reduced in the complemented strains (Fig. 3). This provides a tenable explanation for their polymyxin B supersusceptibility, as the peptide would be able to translocate across the outer membrane more easily than in the wild type.

**Analysis of lipid A modifications.** A previous study had shown that the level of resistance to polymyxins observed *in vitro* is related to the induction of lipid A modifications with aminoarabinose by polymyxins themselves (11). Using knockout mutants, it was demonstrated that the lack of aminoarabinose modification of LPS rendered the bacteria more susceptible to the inducing cationic antibiotic. Therefore, those mutants defective in the acquisition of such adaptation, such as the *parR* regulatory mutant and the *arn* operon effector mutants, exhibit increased susceptibility to this type of antibiotic (11, 13). To test whether lipid A modification was hampered in the four LPS mutants of interest (*galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg*), the lipid A species present in these strains were analyzed under low-Mg<sup>2+</sup> growth conditions. These conditions are known to trigger LPS modification in *P. aeruginosa*, and, in agreement with this, lipid A analysis of the wild-type PA14 showed the presence of aminoarabinoxylated ion peaks with *m/z* values of 1747 and 1763, which correspond, respectively, to the hexa-acylated species with *m/z* values of 1616 and 1632 with the addition of one aminoarabinose molecule (Fig. 4). In contrast,

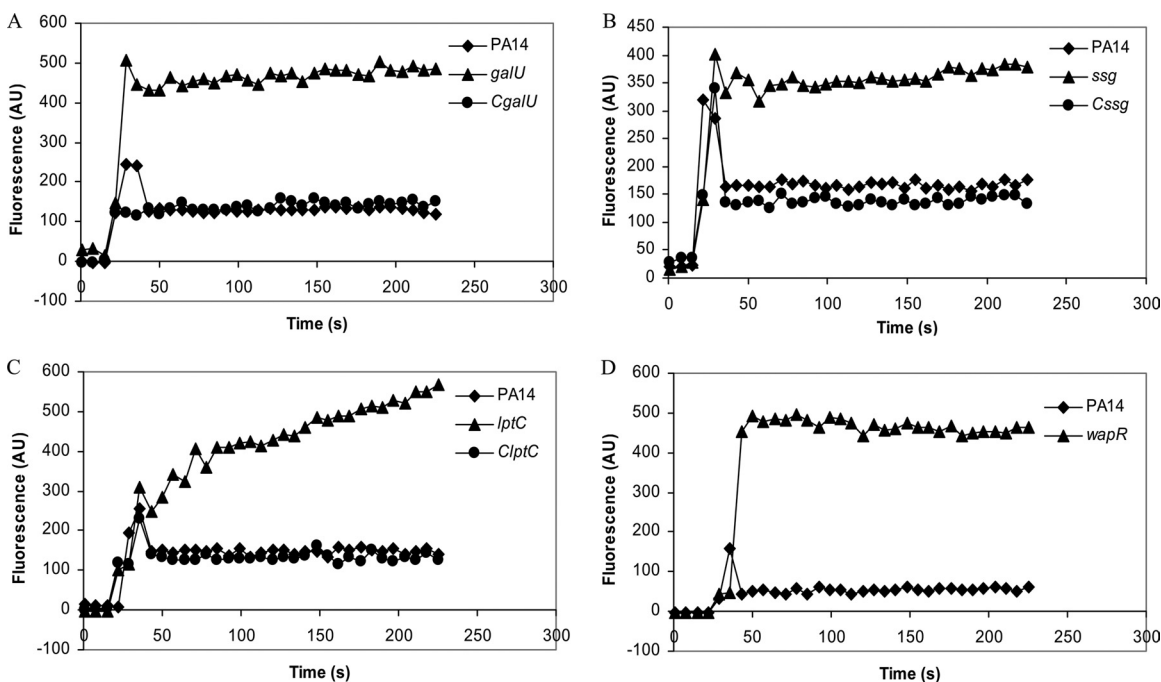
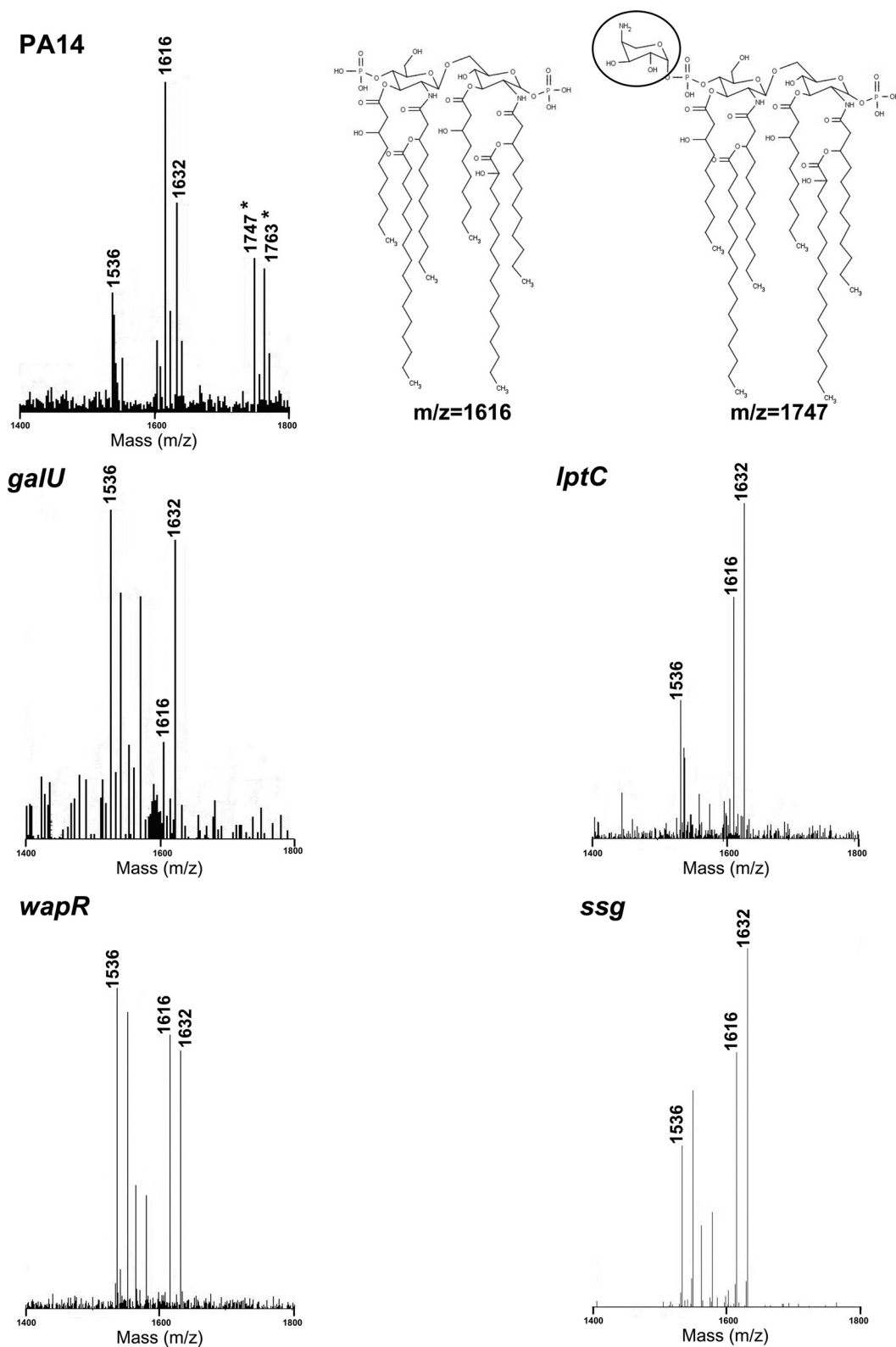


FIG 3 Partitioning of NPN into the outer membranes of different *P. aeruginosa* strains. (A) Wild-type PA14, *galU* mutant, and complemented *CgalU* strain; (B) wild-type PA14, *ssg* mutant, and complemented *Cssg* strain; (C) wild-type PA14, *lptC* mutant, and complemented *ClptC* strain; (D) wild-type PA14 and *wapR* mutant. Greater emission of fluorescence corresponds to greater outer membrane permeability to NPN, which fluoresces only after it partitions into the membrane and is excluded by the outer membrane barrier of wild-type cells. The graphs show results from one representative experiment out of at least three with the same trends. AU, arbitrary units.



**FIG 4** MALDI-TOF MS reflectron mode analysis of lipid A from the PA14, *galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg* strains and structures of selected lipid A species, showing the aminoarabinose in the modified species inside a circle. Only selected peaks of interest are labeled for the sake of clarity. Differences in  $m/z$  units of 16 and 80 correspond to the loss or addition of a hydroxyl or a phosphate group, respectively. Asterisks represent aminoarabinosylated lipid A species.



**TABLE 4** RT-qPCR analysis of the expression of the *arn* operon under low-magnesium conditions in selected mutant strains relative to wild-type PA14

Mutant	Fold change (mean $\pm$ SD) in <i>arnB</i> expression
<i>galU</i>	1.51 $\pm$ 0.30
<i>lptC</i>	1.94 $\pm$ 0.25
<i>wapR</i>	1.28 $\pm$ 0.22
<i>ssg</i>	1.45 $\pm$ 0.47

lipid A analysis by MALDI-TOF MS indicated that all four LPS mutants lacked the aminoarabinoxylated forms observed in the wild type (Fig. 4). A decrease in the presence and/or inducibility of aminoarabinose-modified lipid A species would, therefore, provide an additional explanation for the supersusceptible phenotype of these mutants.

To determine if the loss of lipid A modification was due to a lower level of expression of the LPS modification (*arn*) operon under low-Mg<sup>2+</sup> growth conditions, we performed RT-qPCR experiments. RNA was prepared from cultures of the wild-type PA14 as well as the mutants with mutations in the genes *galU*, *lptC*, *wapR*, and *ssg* grown in a low (20  $\mu$ M)-Mg<sup>2+</sup> BM2 medium. However, this did not reveal any defect in the transcription of the *arnB* gene (the first gene in the *arn* operon) in any of the mutants compared to the wild type (Table 4). Therefore, it seems likely that the mechanisms determining this altered phenotype occur at the posttranscriptional level, possibly in the modification, with aminoarabinose, of the structurally altered mutant LPS.

In the case of *galU*, previous studies with *P. mirabilis* (39) and *Y. pestis* (40) revealed an impact of the *galU* mutation on lipid A modification and polymyxin B susceptibility. The product of *galU*, UDP-glucose phosphorylase, catalyzes the biosynthesis of UDP-glucose (49), a precursor of aminoarabinose, so the most likely explanation for the loss of lipid A modification would be the inability of this mutant strain to synthesize aminoarabinose. Further experiments will be necessary to explain why the other three mutants, namely, the *lptC*, *wapR*, and *ssg* mutants, did not exhibit aminoarabinoxylated lipid A species under low-magnesium conditions. Nonetheless, it can be speculated that the altered LPS structure observed in these mutants might hinder the addition of aminoarabinose to the lipid A.

**Concluding remarks.** *P. aeruginosa* exhibits a quite small intrinsic polymyxin B resistome, as well as a relatively limited capacity for mutational resistance through gene knockout, compared to other types of antimicrobials. However, it must be noted that, due to the limitations associated with screening a transposon mutant library, not all *P. aeruginosa* genes could be evaluated for their participation in polymyxin B resistance. For example, the library does not have transposon mutants corresponding to essential genes (for instance, *waaF* and *waaC*, encoding heptosyltransferases, and *waaP*, encoding a sugar kinase involved in phosphorylation of the heptose residues in the inner core [50]), as these would not be viable. However, the screen did identify a transposon insertion in the gene encoding the sensor kinase PhoQ that conferred high-level polymyxin resistance. This correlates with previous results showing that mutations that inactivate *phoQ* confer resistance to polymyxin B and other peptides. The identification of clinical isolates harboring mutations that constitutively activate PhoP (10, 35) emphasizes the importance and clinical relevance of

understanding the pathways regulating modification of lipid A by aminoarabinose in *P. aeruginosa*.

Maintenance of the structure and stability of LPS appears to be the prevalent mechanism of polymyxin B intrinsic resistance in this microorganism, and alterations in this structure lead to susceptibility to polymyxins and, in many cases, also to other antimicrobial peptides. Certain mutations affecting LPS render the bacteria more susceptible by increasing outer membrane permeability and/or inhibiting the addition of aminoarabinose to lipid A. Interestingly, many of the mutations leading to supersusceptibility to polymyxins were found to also confer increased resistance to  $\beta$ -lactams. Furthermore, overlaps with aminoglycoside and fluoroquinolone resistance screenings were also observed. The finding of such overlapping mutants among these screenings highlights the importance of defining the *P. aeruginosa* resistome. This information will be very useful in defining critical overlaps in adaptive resistance that might drive multidrug resistance and for the design of improved therapies that exploit redundancies between the resistance mechanisms to different antibiotic classes.

Overall, these results provide us with a clearer picture of the mechanisms of resistance to polymyxins and other antimicrobial peptides in *P. aeruginosa*. The apparently well-defined intrinsic resistance determinants together with the relatively limited possibilities for mutational resistance make this type of antibiotic very useful as an antipseudomonal agent, as long as it is used appropriately. Moreover, our data give an indication of which genes should be analyzed to follow the evolution of polymyxin resistance in the clinic.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from Cystic Fibrosis Canada (CFC) to R.E.W.H. and J.S.L. and grants BIO2011-25255, HEALTH-F3-2011-282004, and HEALTH-F3-2010-241476 to J.L.M. L.F. received a postdoctoral fellowship from the Fundacion Alfonso Martin Escudero (Spain). I.W. was supported by the Juergen Manchot Foundation and the Mukoviszidose e.V., Bonn, Germany (German Cystic Fibrosis Association). J.O. is the recipient of a fellowship from Programa Beca Chile, CONICYT. D.K. received a postdoctoral fellowship from CFC. R.E.W.H. holds a Canada Research Chair in Microbiology, and J.S.L. holds a Canada Research Chair in Cystic Fibrosis and Microbial Glycobiology.

We thank Suzanne Perry, M. Stephen Trent, and Shaan Gellatly for their help and advice with the LPS and lipid A experiments.

## REFERENCES

1. Bonomo RA, Szabo D. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Infect. Dis. 43: SS49–SS56.
2. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2:1051–1060.
3. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. 2005. Cystic fibrosis. N. Engl. J. Med. 352:1992–2001.
4. Hancock REW, Speert DP. 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist. Updat. 3:247–255.
5. Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin. Infect. Dis. 40:1333–1341.
6. Zhang L, Dhillon P, Yan H, Farmer S, Hancock REW. 2000. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 3317–3321.
7. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. 2010. Resistance to polymyx-



- ins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist. Updat.* 13:132–138.
8. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, Høiby N, Moskowitz SM. 2011. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5761–5779.
9. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, Selgrade SE, Miller SI, Denton M, Conway SP, Johansen HK, Høiby N. 2012. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1019–1030.
10. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. 2011. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:1211–1221.
11. Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock REW. 2010. Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3372–3382.
12. Macfarlane ELA, Kwasnicka A, Ochs MM, Hancock REW. 1999. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* 34:305–316.
13. McPhee JB, Lewenza S, Hancock REW. 2003. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 50:205–217.
14. Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock REW, Martínez JL. 2010. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4159–4167.
15. Breidenstein EBM, Khaira BK, Wiegand I, Overhage J, Hancock REW. 2008. Complex ciprofloxacin resistance revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:4486–4491.
16. De Groote VN, Verstraeten N, Fauvart M, Kint CI, Verbeeck AM, Beullens S, Cornelis P, Michiels J. 2009. Novel persistence genes in *Pseudomonas aeruginosa* identified by high-throughput screening. *FEMS Microbiol. Lett.* 297:73–79.
17. Dötsch A, Becker T, Pommerenke C, Magnowska Z, Jänsch Häussler LS. 2009. Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2522–2531.
18. Gallagher LA, Shendure J, Manoil C. 2011. Genome-scale identification of resistance functions in *Pseudomonas aeruginosa* using Tn-seq. *mBio* 2(1):e00315–10. doi:10.1128/mBio.00315–10.
19. Schurek KN, Marr AK, Taylor PK, Wiegand I, Semenec L, Khaira BK, Hancock REW. 2008. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:4213–4219.
20. Fernández L, Breidenstein EBM, Hancock REW. 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist. Updat.* 14:1–21.
21. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, Ausubel FM. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:2833–2838.
22. Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmeler B, Baquero F, Martínez JL. 2008. The neglected intrinsic resistance of bacterial pathogens. *PLoS One* 3:e1619. doi:10.1371/journal.pone.0001619.
23. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3:163–175.
24. McPhee JB, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS, Hancock REW. 2006. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to  $Mg^{2+}$ -induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188:3995–4006.
25. Hitchcock PJ, Brown TM. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154:269–277.
26. Fomsgaard A, Freudenberg MA, Galanos C. 1990. Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 28:2627–2631.
27. Zhou Z, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. 1999. Lipid A modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> in *Escherichia coli* K12. Detection of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, phosphoethanolamine and palmitate. *J. Biol. Chem.* 274:18503–18514.
28. Moore RA, Bates NC, Hancock REW. 1986. Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:496–500.
29. Loh B, Grant C, Hancock REW. 1984. Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:546–551.
30. Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132:365–386.
31. Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE, Brinkman FS. 2011. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* 39:D596–D600.
32. Elzer PH, Kovach ME, Phillips RW, Robertson GT, Peterson KM, Roop II RM. 1995. *In vivo* and *in vitro* stability of the broad host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species. *Plasmid* 33:51–57.
33. Baquero F. 2001. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist. Updat.* 4:93–105.
34. Gooderham WJ, Gellatly SL, Sanschagrin F, McPhee JB, Bains M, Cosseau C, Levesque RC, Hancock REW. 2009. The sensor kinase PhoQ mediates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 155:699–711.
35. Barrow K, Kwon DH. 2009. Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:5150–5154.
36. Masoud H, Altman E, Richards JC, Lam JS. 1994. A general strategy for structural analysis of the oligosaccharide region of lipopolysaccharides. Structure of oligosaccharide component of *Pseudomonas aeruginosa* IATS serotype O6 mutant R5 rough-type lipopolysaccharide. *Biochem. J.* 303:10568–10578.
37. Priebe GP, Dean CR, Zaidi T, Meluleni GJ, Coleman FT, Coutinho YS, Noto MJ, Urban TA, Pier GB, Goldberg JB. 2004. The *galU* Gene of *Pseudomonas aeruginosa* is required for corneal infection and efficient systemic spread following pneumonia but not for infection confined to the lung. *Infect. Immun.* 72:4224–4232.
38. Lin J, Wang Y, Hoang KV. 2009. Systematic identification of genetic loci required for polymyxin resistance in *Campylobacter jejuni* using an efficient *in vivo* transposon mutagenesis system. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:173–185.
39. Jiang SS, Lin TY, Wang WB, Liu MC, Hsueh PR, Liaw SJ. 2010. Characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis*: defectiveness in polymyxin B resistance, swarming, and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2000–2009.
40. Klein KA, Fukuto HS, Pelletier M, Romanov G, Grabenstein JP, Palmer LE, Ernst R, Bliska JB. 2012. A transposon site hybridization screen identifies *galU* and *wecBC* as important for survival of *Yersinia pestis* in murine macrophages. *J. Bacteriol.* 194:653–662.
41. Kocíncová D, Ostler SL, Anderson EM, Lam JS. 2012. Rhamnosyltransferase genes *migA* and *wapR* are regulated in a differential manner to modulate the quantities of core oligosaccharide glycoforms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 194:4295–4300.
42. Poon KK, Westman EL, Vinogradov E, Jin S, Lam JS. 2008. Functional characterization of MigA and WapR: putative rhamnosyltransferases involved in outer core oligosaccharide biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190:1857–1865.
43. Veeranagouda Y, Lee K, Cho AR, Cho K, Anderson EM, Lam JS. 2011. Ssg, a putative glycosyltransferase, functions in lipo- and exopolysaccharide biosynthesis and cell surface-related properties in *Pseudomonas alkylphenolia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 315:38–45.
44. Sperandio P, Lau FK, Carpentieri A, De Castro C, Molinaro A, Dehò G, Silhavy TJ, Polissi A. 2008. Functional analysis of the protein machinery required for transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190:4460–4469.

45. Rahim R, Burrows LL, Monteiro MA, Perry MB, Lam JS. 2000. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**:2803–2814.
46. Choudhury B, Carlson RW, Goldberg JB. 2005. The structure of the lipopolysaccharide from a *galU* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* serogroup-O11. *Carbohydr. Res.* **340**:2761–2772.
47. Dean CR, Goldberg JB. 2002. *Pseudomonas aeruginosa galU* is required for a complete lipopolysaccharide core and repairs a secondary mutation in a PA103 (serogroup O11) *wbpM* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**:277–283.
48. Yokota S, Fujii N. 2007. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **30**:97–109.
49. Nesper J, Lauriano CM, Klose KE, Kapfhammer D, Kraiss A, Reidl J. 2001. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**:435–445.
50. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Hao Y, Kocíncová D. 2011. Genetics and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Front. Microbiol.* **2**:118.

# The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to $\beta$ -lactams

Carolina Alvarez-Ortega,<sup>1</sup> Irith Wiegand,<sup>2</sup> Jorge Olivares,<sup>1</sup> Robert E.W. Hancock<sup>3</sup> and José Luis Martínez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología Microbiana; Centro Nacional de Biotecnología; CSIC; Madrid, Spain; <sup>2</sup>AiCuris GmbH & Co. KG; Wuppertal, Deutschland;

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology; Centre for Microbial Diseases and Immunity Research; University of British Columbia; Vancouver, BC Canada

*Pseudomonas aeruginosa* is a relevant opportunistic pathogen particularly problematic due to its low intrinsic susceptibility to antibiotics. Intrinsic resistance has been traditionally attributed to the low permeability of cellular envelopes together with the presence of chromosomally-encoded detoxification systems such as multidrug efflux pumps or antibiotic inactivating enzymes. However, some recently published articles indicate that several other elements can contribute to the phenotype of intrinsic resistance of bacterial pathogens. In a recently published article, we explored the chromosomally-encoded determinants that contribute to the phenotype of susceptibility of *P. aeruginosa* to ceftazidime, imipenem and carbapenem. Using a comprehensive library of transposon-tagged insertion mutants, we found 37 loci in the chromosome of *P. aeruginosa* that contributed to its intrinsic resistance, because mutants in these loci were more susceptible to antibiotics than their parental strain. Forty one further loci could potentially be involved in the acquisition of resistance, because mutants in these loci were less susceptible than their wild-type counterpart. These results indicate that the intrinsic resistome of *P. aeruginosa* involves several elements, belonging to different functional families and cannot be considered as a specific mechanism of adaptation to the recent usage of antibiotics as therapeutic agents. In the current article, we summarize the findings of the paper and discuss their implications for understanding the evolution of antibiotic resistance and for defining novel targets for the search of new antimicrobials.

Finally, the validity of recent theories on the mechanisms of action of antibiotics is discussed taken into consideration the results of our paper and other recently published works on the mechanisms of intrinsic resistance to antibiotics of *P. aeruginosa*.

Antibiotic resistance is frequently considered as an acquired trait of bacterial populations, which has become prominent very recently (in evolutionary terms) as the consequence of the introduction of antibiotics for the treatment of infectious diseases.<sup>1,2</sup> Since resistance can be achieved either as the consequence of mutation<sup>3</sup> or due to the horizontal acquisition of resistance genes,<sup>4</sup> it has been largely assumed that the origin of such resistance genes are the microorganisms producing antibiotics, since they need to carry resistance elements to avoid the inhibitory action of the antibiotics they produce.<sup>5,6</sup> Possibly due to these views regarding the origins of resistance, and the forces that shape its evolution, intrinsic resistance has not been analyzed in full detail until recently. It is of critical importance in opportunistic pathogens that present a characteristic low natural susceptibility to antibiotics. Intrinsic resistance has traditionally been attributed to a reduced permeability of the cell envelope due to decreased uptake. This is a dependent mechanism in the sense that restricted permeability is hard-wired into the cell and slows down rather than prevents the uptake of antibiotic. The characterization of chromosomally-encoded antibiotic-inactivating enzymes (such as  $\beta$ -lactamases) and multidrug (MDR) efflux pumps demonstrated that bacterial

**Key words:** Intrinsic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*,  $\beta$ -lactam resistance,  $\beta$ -lactamase, resistome

Submitted: 12/03/10

Revised: 01/31/11

Accepted: 01/31/11

DOI: 10.4161/viru.2.2.15014

Correspondence to: José Luis Martínez;  
Email: jlmartinez@cnb.csic.es

Addendum to: Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock REW, Martinez JL. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:4159–67; PMID: 20679510; DOI: 10.1128/AAC.00257-10.

cells harbor further intrinsic mechanisms that can act in synergy with slowed uptake to reduce the activity of the antibiotics. Differing from reduced permeability, the latter are detoxification elements that resemble the classical determinants of antibiotic resistance acquired by horizontal gene transfer. However, since these elements are widespread, can be encoded in the core-genome and, in the case of MDR efflux pumps, are present in the chromosomes of all organisms, including those that do not produce antibiotics,<sup>7,8</sup> they might have evolved for purposes other than just avoiding the activity of a given antibiotic. Indeed, the recent analyses of comprehensive transposon-tagged mutant libraries in different organisms such as *Escherichia coli*<sup>9,10</sup> or *Pseudomonas aeruginosa*<sup>11–14</sup> demonstrated the existence of several genes that cause changes in antibiotic susceptibility when they are inactivated. Among those genes, several encode for proteins involved in bacterial metabolism, indicating that intrinsic antibiotic resistance is not just the consequence of bacterial adaptation to the presence of antibiotics, but rather a characteristic phenotype highly dependent on the metabolic networks of each bacterial species. Indeed it may reflect an adaptation to a distinct growth state such as afforded by biofilm development and swarming motility both of which are multigenic phenomena associated with major increases in antibiotic resistance and metabolic changes.<sup>15,16</sup>

In a recent paper, we analyzed a comprehensive library of transposon-tagged insertion mutants with the aim of finding genes that changed the susceptibility of *P. aeruginosa* to  $\beta$ -lactams upon inactivation.<sup>17</sup> This bacterial species is one of the most important opportunistic pathogens,<sup>18</sup> causing severe infections in hospitals and being the major pathogen associated with eventually fatal chronic infections that afflict patients with cystic fibrosis, the most prevalent inherited disease in Caucasian populations. *P. aeruginosa* is particularly problematic due to its low intrinsic antibiotic susceptibility<sup>19</sup> in part based on its exceptionally low outer membrane permeability.<sup>20</sup> The antibiotics chosen for the analysis were a cephalosporin (ceftazidime) and two

carbapenems (meropenem and imipenem) that are currently used for treating *P. aeruginosa* infections. Two carbapenems were included in order to check whether intrinsic resistance to drugs belonging to the same structural family might have some degree of specificity. We studied mutants that showed a higher susceptibility, reflecting proteins that contribute to intrinsic resistance, as well as mutants with decreased susceptibility, which define the genetic reservoir of *P. aeruginosa* for evolving towards resistance without acquiring foreign DNA.

One of our main objectives was to look for small changes in antibiotic susceptibility. Antibiotic resistance can be defined using operational criteria, which take into account the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the antibiotics to establish those values above which a therapeutically useful concentration is difficult to achieve. If the MIC for a bacterium is above these values, a risk exists that the infection cannot be successfully treated. Because of this, it is usually assumed that the microorganisms should be categorized as resistant when their MICs are above a pre-defined threshold. This definition, which has a clear relevance in the clinical world, does not take into consideration low-level resistance mechanisms. In our work we took into consideration this type of mutants because low-level resistance is relevant to the development of high level resistance<sup>21,22</sup> and is also likely the cause of MIC-creep, defined as the constant rise over time in the basal intrinsic resistance of an average isolate of a given bacterial species.<sup>23</sup> Low-level resistance is difficult to track using conventional double-dilution tests of antibiotic susceptibility. Because of this, we confirmed our screen results by determining MICs using the Epsilon-Test, which allows for the accurate discrimination between small changes in MIC values. Applying a threshold on MIC change of two-fold, we found that 37 loci in the chromosome of *P. aeruginosa* contributed to its intrinsic resistance to antibiotics (mutants in these loci were more susceptible than their wild-type parental strain), whereas 41 could potentially be involved in the acquisition of resistance upon their inactivation (mutants in these

loci were less susceptible than the wild-type). As these studies were restricted to transposon mutants it is likely that there are other genes in the resistome that cannot be knocked out due to their essentiality for growth on common lab media. Additionally other proteins expressed in infection of the host may not be expressed in vitro and such proteins contributing to the resistome would not have been found in our study.

The antibiotics used in our screen affect cell wall synthesis by interacting with penicillin-binding proteins and murein hydrolases, therefore we expected to detect a core set of loci involved in the susceptibility to this family of antibiotics. To our surprise, the overlap among the different phenotypes was very low. Only one mutant (in PA0908) presented reduced susceptibility to all three antibiotics and two (in *glnK* and *ftsK*) showed an increased susceptibility to all three antibiotics. These last two mutants revealed genes that are potential good targets in looking for drugs that, like the  $\beta$ -lactamase inhibitors, increase the efficacy of antibiotics against resistant organisms.

Those genes that when inactivated resulted in changes in susceptibility to  $\beta$ -lactams encode for proteins that belong to a variety of functional groups, including metabolic enzymes such as phosphoenolpyruvate carboxykinase, elements involved in cell attachment and motility such as fimbrial proteins or chemotaxis proteins, elements involved in the biosynthesis of LPS and in alginate production, and transcriptional regulators. More classical resistance elements such as the transporter of carbapenems, OprD2, regulators of efflux pumps like NalC, elements of these efflux pumps, like OprM or elements involved in the regulation of the expression of the *P. aeruginosa* chromosomally-encoded  $\beta$ -lactamases, like those encoded by *dacB*, *mpl*, *ampR* and *ampD* emerged as well in our screening further validating our experimental approach. Altogether our results indicate that the intrinsic resistome of *P. aeruginosa* involves several different elements and might be considered as an emergent property of the system more than a specific mechanism of adaptation to the presence of antibiotics. A recently



published theory on the mechanism of action of bactericidal antibiotics suggests that they share a common pathway in bacterial killing involving the generation of oxygen radicals, through the interference of such antibiotics with the bacterial metabolism.<sup>24,25</sup> From this model, it can be predicted that mutations in genes coding for proteins involved in the bacterial metabolism might be relevant in the development of resistance or supersusceptibility. Unfortunately, our results did not support a general role of oxygen radicals in killing. Indeed although some of the mutations analyzed in our work were previously found to be involved in the intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to other drugs, most of the mutants were specific, indicating that the mechanisms of activity of the antibiotics and thus the mechanisms of intrinsic resistance are not as general as might be expected based on the common pathway concept. Furthermore, the percentage of mutants presenting the same phenotype (increased or decreased susceptibility) for imipenem and meropenem was not high, despite both antibiotics being carbapenems. Another interesting issue, raised as well in other studies on intrinsic resistomes<sup>26</sup> is the finding of some degree of strain-specificity. Whereas some elements contributed to resistance in both *P. aeruginosa* strains PAO1 and PA14, others are strain-specific. This might be due to different expression levels of these elements in either of the strains or to the existence of changes in their respective metabolic and/or regulatory networks.

As a conclusion of our work, and consistent with other published studies, it can be stated that the intrinsic resistome of *P. aeruginosa* involves a large array of elements. Furthermore, the analysis of mutants causing a reduced susceptibility to  $\beta$ -lactams indicates that this bacterial species has a high potential to evolve towards resistance. Given that mutation is the main mechanism whereby *P. aeruginosa* develops resistance during chronic infections,<sup>27,28</sup> the results presented in our article and others dealing with the intrinsic resistome of this bacterial pathogen might help to define novel elements involved in the acquisition of resistance during such infections.

## Acknowledgements

Research in JLM laboratory was supported by BIO2008-00090 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, and KBBE-227258 (BIOHYPO) and HEALTH-F3-2010-241476 (PAR) from European Union. REWH was supported by the Canadian Cystic Fibrosis Foundation. CA is the recipient of a JAE contract from CSIC. JO is the recipient of a fellowship from Programa Beca Chile, CONICYT. REWH holds a Canada Research Chair. IW thanks the Juergen Manchot Foundation and the Mukoviszidose e.V., Bonn, Germany (German Cystic Fibrosis Association), for financial support.

## References

- Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martinez-Solano L, et al. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33:44-65.
- Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 2007; 128:1037-50.
- Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1771-7.
- Davies JE. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp* 1997; 207:15-27.
- D'Aosta VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 2006; 311:374-7.
- Benveniste R, Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:2276-80.
- Alonso A, Rojo F, Martinez JL. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* 1999; 1:421-30.
- Martinez JL, Sanchez MB, Martinez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, Alvarez-Ortega C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33:430-49.
- Liu A, Tran L, Becker E, Lee K, Chinn L, Park E, et al. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1393-403.
- Tamae C, Liu A, Kim K, Sitz D, Hong J, Becker E, et al. Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2008; 190:5981-8.
- Schurek KN, Marr AK, Taylor PK, Wiegand I, Semenec L, Khaira BK, et al. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:4213-9.
- Breidenstein EB, Khaira BK, Wiegand I, Overhage J, Hancock REW. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:4486-91.

- Fajardo A, Martinez-Martin N, Mercadillo M, Galan JC, Ghysels B, Matthijs S, et al. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS ONE* 2008; 3:e1619.
- Girgis HS, Hottes AK, Tavazoie S. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS ONE* 2009; 4:e5629.
- Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock REW. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* 2008; 190:2671-9.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-8.
- Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock REW, Martinez JL. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4159-67.
- Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18:306-13.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:582-610.
- Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Ann Rev Microbiol* 2002; 56:17-38.
- Baquero F. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist Updat* 2001; 4:93-105.
- El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plesiat P. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1016-21.
- Steinkraus G, White R, Friedrich L. Vancomycin MIC<sup>+</sup> creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:788-94.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:423-35.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 2007; 130:797-810.
- De Groote VN, Verstraeten N, Fauvart M, Kint CI, Verbeeck AM, Beullens S, et al. Novel persistence genes in *Pseudomonas aeruginosa* identified by high-throughput screening. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 297:73-9.
- Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, et al. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol* 2008; 190:7910-7.
- Macia MD, Blanquer D, Togores B, Saulea J, Perez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:3382-6.



## **PART II**

---

### **FATE**





---

# 9

---

## ENVIRONMENTAL POLLUTION BY ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES

JOSE LUIS MARTINEZ AND JORGE OLIVARES

*Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain*

### 9.1 INTRODUCTION

Since World War II, antibiotics have been widely used for the treatment of infectious diseases, likely being the most successful group of drugs developed by humankind. Nevertheless, the use of these chemicals is not limited to treating human infections. They have been used as well in farming, aquaculture, and agriculture both for treating (or preventing) infections and as growth promoters in animals (Cabello, 2006; McManus et al., 2002; Singer et al., 2003; Smith et al., 2002). All of these practices imply that large amounts of antibiotics have been (and are being) released in many natural ecosystems (Hu et al., 2010; Kümmerer, 2009a; 2009b; Lindberg et al., 2007; Martinez, 2009a; McArthur and Tuckfield, 2000; Yiruhan et al., 2010). Although it has been described that pollution by antibiotics might have some effects on the development of plants (Xie et al., 2010), the major effect of this contamination will be on the overall composition of the environmental microbiota (Grimes et al., 1984; Naslund et al., 2008), mainly in terms of selecting antibiotic-resistant bacteria (Baya et al., 1986; Blanco et al., 2009; Brandt et al., 2009; Martinez, 2008, 2009a). Despite this situation, and although the effect of the use of antibiotics on the development of resistance by human and animal bacterial pathogens has been studied in detail (Aarestrup, 2005; Alekshun and Levy, 2007; Ferber, 2003; Levy, 1998; Levy and Marshall, 2004; Levy and O'Brien, 2005; Pereira-Leal et al., 2006; Singer et al., 2003), information on the effect of pollution by antibiotics on the population dynamics of the environmental microbiosphere is still scarce. One important aspect of this type of pollution is that the release of antibiotics present in wastewaters from farms, hospitals, or cities is usually accompanied by the release of resistance genes currently

---

*Antimicrobial Resistance in the Environment*, First Edition.

Edited by Patricia L. Keen and Mark H.M.M. Montforts.

© 2011 John Wiley & Sons, Inc. Published 2011 by John Wiley & Sons, Inc.

disseminated among human and animal-linked bacteria (Baquero et al., 2008; Kümmerer, 2004; Martinez, 2008, 2009a). Agricultural fertilization using organic wastes, mainly from livestock and sewage sludge from urban effluents, contributes as well to the release of antibiotic resistance genes in natural ecosystems (Blanco et al., 2009; Gerba and Smith, 2005; O'Connor et al., 2005).

Several studies have addressed the prevalence of antibiotic resistance genes in natural ecosystems, and, occasionally, the finding of antibiotic-resistant bacteria has been considered as evidence of contamination with an anthropogenic origin. As we will see later on, this might occur when the resistance determinants found are the same as those already disseminated among human pathogens (Baquero et al., 2009; Martinez, 2008, 2009a). However, natural ecosystems (and not clinical ones) are the origin of the resistance elements (Aminov, 2009; Baquero et al., 2009; Davies, 1994, 1997; Martinez, 2008, 2009b) acquired by human pathogens by horizontal gene transfer (HGT) in such a way that the finding of an unknown resistance gene in a natural (not clinical) ecosystem should not be considered as a surprise. In this regard, it is important to mention here that antibiotic resistance genes are ubiquitous in all ecosystems, either contaminated or pristine, or even in the commensal microbiota of wild animals (Allen et al., 2009; D'Acosta et al., 2006; Wright, 2007).

Nevertheless, among all these determinants capable of conferring resistance upon their transfer to a new host, only some of them have been acquired by human pathogens (Aleksun and Levy, 2007; Baquero et al., 2009; Fajardo et al., 2009; Martinez et al., 2007, 2009b). When talking about pollution by resistance genes (Pruden et al., 2006), we thus refer to these specific determinants that have been acquired by human-linked bacteria after the introduction of antibiotics for therapy. Indeed, the analysis of bacterial isolates from the preantibiotic era demonstrated that the types and amounts of plasmids carried by pathogenic bacteria were similar to what can be found today, the only difference being that the plasmids from the preantibiotic era did not contain resistance determinants, whereas currently they harbor resistance genes acquired through HGT, acquisition and spread being direct consequences of the strong selective pressure exerted during the treatment of the infections (Datta and Hughes, 1983).

It is thus clear that one of the consequences of the use of antibiotics for therapy has been the spread of a number of specific antibiotic resistance genes among human pathogens (and commensals). In other words, over the course of the last 60 years, there has been a strong enrichment and a wide spread among different hosts of a small subset of resistance genes [as compared with the large number of different resistance determinants present in natural ecosystems; see (D'Acosta et al., 2006)]. For instance, AQ1 the plasmid-encoded TEM1  $\beta$ -lactamase (and its derivatives) is currently widely disseminated (Bradford, 2001; Paterson and Bonomo, 2005), but its origin in the chromosome of an unknown microorganism is still ignored. This supports the notion that, before the antibiotic era, the TEM1 gene was present just in the chromosome of a specific environmental bacterial species, and the use of  $\beta$ -lactams (and further selection) allowed its integration into successful gene transfer units with the consequence of its dissemination and fast evolution. Whereas it is clear that the use of antibiotics has led to the enrichment in clinical isolates of some antibiotic resistance genes, the effect of this utilization in the environmental microbiota has been studied in less detail.

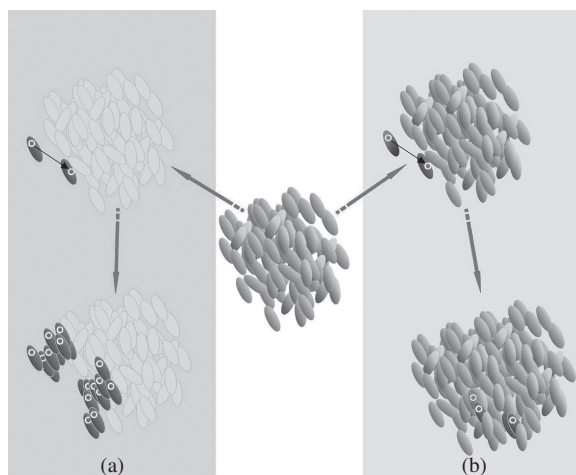
At first sight, and although the antibiotic selective pressure is lower in natural ecosystems than in clinical settings, we have to take into consideration that from the

time that antibiotics were introduced for therapy, they have been common environmental pollutants (de Souza et al., 2009; Hu et al., 2010; Karci and Balcioglu, 2009; Venglovsky et al., 2009; Yiruhan et al., 2010), constantly introduced in natural ecosystems from human, animal and, industrial (e.g., antibiotics-producing companies) waste disposals. Human activities, including the use of antibiotics for human treatment, but also in farms and fisheries, as well as the use of organic wastes for agricultural fertilization, might have an impact the environmental microbiota in three aspects that are relevant for the evolution and spread of resistance with clinical relevance: (i) Selection of antibiotic resistant microorganisms in natural ecosystems, including intrinsically resistant bacteria. Given that some relevant opportunistic pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* (Lister et al., 2009), different species of the genus *Burkholderia* (McGowan, 2006; Spicuzza et al., 2008), *Acinetobacter baumannii* (Navon-Venezia et al., 2005; Sader and Jones, 2005), or *Stenotrophomonas maltophilia* (Looney et al., 2009; Sanchez et al., 2009), which are characterized by presenting low susceptibility to antibiotics, have an environmental origin, the enrichment of these populations by the indiscriminate release of antibiotics might impact human health; (ii) spreading of antibiotic resistance determinants by gene transfer elements (Baquero, 2004). Since gene transfer units confer a cost to the new host (fitness costs), gene transfer is a rewarding evolutionary strategy (Baquero, 2004; Baquero et al., 2009; Martinez et al., 2007) only when the element present in the gene transfer unit confers an adaptive advantage to the new host (Fig. 9.1). In the case of resistance genes, this adaptive advantage occurs upon pollution by antibiotics (Martinez, 2009a), in such a way that antibiotic resistance can be considered as a colonization factor in environments with high antibiotic load (Martinez and Baquero, 2002). (iii) The maintenance and difficult eradication of the antibiotic resistance genes from natural ecosystems. One important aspect in the pollution by antibiotic resistance genes is that the wastes from hospitals and farms contain not only resistance genes but their selectors as well—the antibiotics. The constant release of antibiotics into natural ecosystems, together with resistance genes, will thus favor the maintenance and dissemination of resistance among environmental microbiota (Martinez, 2009a).

Environmental pollution with antibiotic resistance genes might be a relevant problem for human health since their release upon integration in gene transfer units might allow their successful spread into natural bacterial populations, creating a relevant reservoir of these elements (Simoes et al., 2010) that, in turn, might be difficult to eradicate (Martinez et al., 2007). In this chapter, we will discuss the impact of the contamination of natural ecosystems by antibiotic resistance determinants for these ecosystems and for human health as well.

## 9.2 ANTIBIOTICS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES AS REGULAR COMPONENTS OF NATURAL ECOSYSTEMS

The first antimicrobial agents were derivatives of heavy metals (MacLeod, 1912) or arsenic (Thorburn 1983) or compounds obtained by chemical synthesis such as sulfonamides (Yates, 1939). However, after the finding by Fleming of the naturally produced antibiotic penicillin (Fleming, 1944), it was evident that environmental microorganisms should be able to produce antimicrobials. In a seminal paper,



**FIGURE 9.1 Second-order selection of transfer of antibiotic resistance genes in the presence of antibiotics.** Once an antibiotic resistance gene is present in a gene transfer element, it can be spread among different hosts. Nevertheless, carrying this element will produce a fitness cost, so that in the absence of antibiotics' selective pressure, resistant bacteria, including those that have received the resistance gene by horizontal gene transfer from the original host, will be outcompeted by the susceptible ones (a). Under circumstances of no selection, acquisition of novel genetic elements is not adaptive. In the presence of antibiotics, however, the growth of susceptible bacteria will be inhibited, and only those containing resistance genes (either the original ones or those that have received the resistance determinant by gene transfer) will be able to grow (b), thus favoring the dissemination of these resistance determinants.

Waksman and Woodruff suggested searching for inhibitors of human pathogens in soil microorganisms based on an ecological hypothesis (Waksman and Woodruff, 1940). Given that human and animals had been releasing large numbers of bacterial pathogens in natural ecosystems for several years and that, in spite of this constant contamination, natural ecosystems do not harbor large numbers of human pathogens, it should be a valid interpretation that the microorganisms in these ecosystems might produce inhibitors of pathogens. The fruitful finding of these compounds, mainly produced by *Actinomyces*, led to the conclusion that the role of antibiotics in natural ecosystems would be indeed fighting against competitors. This can be true on occasions, however, the fact that the concentration of antibiotics in natural ecosystems is likely much lower than the one used for therapy cast doubts on the universal validity of this statement. In fact, some recent articles propose that antibiotics might be signaling molecules at the low concentrations at which they can be found in natural ecosystems (Davies, 2006; Davies et al., 2006; Fajardo and Martinez, 2008; Linares et al., 2006; Yim et al., 2006a; 2006b, 2007).

In contrast to the notion that antibiotics might be weapons in intermicrobial warfare, the most common idea concerning resistance genes is that they are shields to avoid antibiotics' activity, creating the scenario of a "Red Queen" evolution trend in which each partner (the antibiotic producer or the resistant bacteria) must run (evolve) as fast as possible to maintain the homeostasis of the system (Benton, 2010; Clay and Kover, 1996; Laskaris et al., 2010). Under this view, resistance genes should

have originated in the same ecosystem as antibiotics; in other words in natural (nonclinical) environments (Baquero et al., 2009; Fajardo et al., 2009; Martinez, 2008). This idea is in agreement with the fact that the plasmids present in human-linked bacteria isolated from the preantibiotic era did not carry resistance genes (Datta and Hughes, 1983). Among the most suitable organisms that can be the origin of the resistance determinants currently disseminated in bacterial pathogens, we have to take into consideration the antibiotic producers because these organisms require elements capable to protect themselves from the antibiotics that they produce (Benveniste and Davies, 1973; Cundliffe, 1992; Marshall et al., 1998). Several of the resistance determinants acquired by human pathogens through HGT are enzymes that modify the antibiotic: chloramphenicol acetyl transferase acetylate chloramphenicol (Shaw, 1983);  $\beta$ -lactamases hydrolyze  $\beta$ -lactams (Bush and Jacoby, 2010), and several enzymes that acetylate, phosphorylate, or adenylate the aminoglycoside antibiotics (Shaw et al., 1993). The presence of these enzymes in the microorganisms that produce those antibiotics has been demonstrated (Benveniste and Davies, 1973). For example, many species of *Streptomyces*, a natural producer of aminoglycosides, possess aminoglycoside-modifying enzymes capable of inactivating members of this family of antibiotics (Argoudelis and Coats, 1969). Similarly, acetylation of chloramphenicol is commonly found in chloramphenicol producers (Lietman, 1972), as well as tetracycline-resistant determinants such as *otrA* and *otrB* (Pang et al., 1994), which have been found in the tetracycline producers and in members of pathogenic *Mycobacteria*.

Similar to antibiotics, which may have other functional roles in addition to the inhibition of competitors in natural ecosystems (Davies, 2006; Davies et al., 2006; Fajardo and Martinez, 2008; Linares et al., 2006; Yim et al., 2006a), resistance genes may have other functions in their original hosts than resistance to bacteria (Baquero et al., 2009; Martinez, 2008; Martinez et al., 2009b). Moreover, in the case of producers, it has been stated that on occasion, an antibiotic-modifying enzyme might be a part of a biosynthetic pathway more than an element involved in the autoprotection from antibiotic action (Benveniste and Davies, 1973). In fact, in a few specific cases, the resistance genes present in pathogens have been accurately tracked and their original hosts were not antibiotic producers. For example, the plasmid-encoded *Qnr* genes have originated from the chromosomes of aquatic bacteria such as *Shewanella algae* (Poirel et al., 2005a, 2005b; Sanchez et al., 2008) and the CTXM  $\beta$ -lactamases are originally present in the chromosome of *Kluyvera ascorbata* (Canton and Coque, 2006; Humeniuk et al., 2002). Neither of these microorganisms produce antibiotics, and it is unlikely that they are under constant antibiotic selective pressure, mainly in the case of the *Qnr* determinants, since they confer resistance to the quinolone family of synthetic antibiotics.

Examples of antibiotic resistance determinants for which a role other than resistance has been proposed include multidrug (MDR) efflux pumps, aminoglycoside-inactivating enzymes, and  $\beta$ -lactamases. MDR efflux pumps are the more versatile group of genes with a physiological function other than antibiotic resistance (Saier and Paulsen, 2001). These resistance genes can be found in all prokaryotic and eukaryotic organisms (Nikaido, 1998a, 1998b; Saier and Paulsen, 2001), contributing to the intrinsic resistance to antibiotics (Nikaido, 1994) and anticancer drugs (Twentyman, 1997), respectively. It is possible to find as many as 20 different MDR determinants in a genome of a single bacterium. But the most important

feature of these determinants is their capability to extrude a great variety of molecules such as solvents, detergents, aromatic compounds (Isken and de Bont, 1996; Li et al., 1998; Ramos et al., 2002), heavy metals (Silver and Phung, 1996), or quorum-sensing (QS) signal molecules (Aendekerk et al., 2005; Evans et al., 1998; Kohler et al., 2001). Heavy metals and aromatic compounds derived from degradation processes are natural products frequently found in several ecosystems. It is thus possible that MDR determinants from environmental bacteria could be selected for the protection of these organisms against those toxic compounds or for signal trafficking in the case of those pumps capable of extruding QS signals (Martinez et al., 2009a).

Strong arguments support the notion that MDR pumps are evolutionary ancient elements. Phylogenetic studies have shown that the type of transporters and their substrates maintain a strong correlation with the physiology of the respective organism (Ren and Paulsen, 2005). Besides, and although chromosomally encoded transporters could be variable in the same species, depending on the particular ecotype, in many cases bacterial species belonging to the same genus share most of these MDR efflux pumps (Aarestrup, 2005). Finally, the genes coding for these elements usually belong to the bacterial core genome (Alonso et al., 2004). Another good example of resistance genes with an original role different from resistance concerns aminoglycoside-modifying enzymes. Many bacterial species such as *Providencia stuartii* (Macinga and Rather, 1999), *Stenotrophomonas maltophilia* (Lambert et al., 1999), *Serratia* sp. (Shaw et al., 1992), or *Mycobacteria* (Ainsa et al., 1997) present these genes in the chromosome of all isolates, indicating that these resistance elements have not been recently acquired as the consequence of antibiotic selective pressure. It has been stated that they may have evolved from sugar kinases and acetyltransferases (Macinga and Rather, 1999) and might play important roles in bacterial metabolism. An example of this situation is the chromosomally encoded acetyltransferase [AAC(2')-Ia] from *P. stuartii*. This enzyme shows at least one clear physiological function, which is the acetylation of peptidoglycan (Payie et al., 1995). It is important to note that *P. stuartii* is not always in contact with aminoglycosides. Thus, the most suitable function for this enzyme is cell wall metabolism and not antibiotic resistance. A final example concerns  $\beta$ -lactamases. It is worth mentioning that several Enterobacteriaceae harbor chromosomally encoded  $\beta$ -lactamases (Lindberg and Normark, 1986; Livermore and Woodford, 2006), despite the fact that the gut is not known to contain  $\beta$ -lactam producers. It has been stated that the most suitable function of these determinants might deal with the cell wall synthesis, evolving from carboxypeptidases or transpeptidases (Adachi et al., 1992; Knox et al., 1996), and the activity against antibiotics is an emergent property of the system only in the presence of the  $\beta$ -lactam.

The analysis of comprehensive libraries of mutants from different bacterial species (Breidenstein et al., 2008; Dotsch et al., 2009; Fajardo et al., 2008; Tamae et al., 2008) demonstrates that several genes participate in the intrinsic resistance phenotype of these microorganisms, further supporting the observation that genes not originally selected for conferring resistance can contribute to this phenotype.

From the information discussed above, it is clear that a natural background of antibiotics and of resistance determinants exists in environmental microbiota. The variability of these elements is much higher than that found in clinics in which only a few antibiotics are used in therapy and the same resistance genes are found in

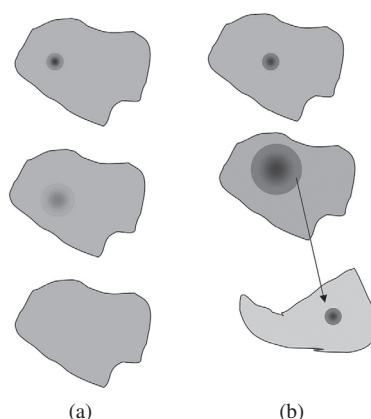
different pathogens and at different geographical locations. What can be thus observed is that the utilization of antibiotics has produced the spread of few specific resistance genes (Baquero et al., 2009; Martinez, 2008). When compared to what is found in natural ecosystems (D'Acosta et al., 2006; Wright 2007), this means that antibiotics reduce the diversity of the potential resistance genes, increasing the concentration of those that are being selected (Baquero et al., 2009; Martinez, 2008; Martinez, 2009a).

Since, as discussed, natural ecosystems constitute both the origin and the reservoir of resistance determinants, it is important to know whether the contamination by antibiotics and resistance determinants might produce a similar effect in the population dynamics of the microbiota present in these natural habitats.

### 9.3 ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES AS POLLUTANTS

Given that resistance genes originate in, and are regular inhabitants of, natural ecosystems, it is important to distinguish when resistance can be considered as a result of pollution and when it represents the normal state of a given ecosystem (Baquero et al., 2009; Martinez, 2008, 2009a, 2009b). An important index of pollution by antimicrobials is the increase of resistant organisms above the normal value. Nevertheless, this increase does not necessarily imply contamination by resistance genes, since antibiotic pollution might enrich the population of intrinsically resistant bacteria as well (see above). Moreover, it has been described that contamination by biocides can enrich the population of bacteria containing some biocide resistance determinants that are frequently associated with resistance genes in gene capture units such as integrons (Gaze et al., 2005; Wright et al., 2008). When defining pollution by resistance genes, we must thus distinguish between the enrichment of naturally resistant bacteria, which is a consequence of pollution with antibiotics (or other toxics, see above) and the release of those genes that have been already acquired by human pathogens and are present in the wastes discharged in nature. For example, it has been described that natural antibiotic-resistant bacterial populations can be found in regions where contact with humans is unlikely, such as the deep terrestrial subsurface (Brown and Balkwill, 2009), the deep Greenland ice core (Miteva et al., 2004), or the waters of the Antarctic Ocean (De Souza et al., 2006). The resistance genes present in these bacteria most likely constitute their intrinsic resistome, understood as all the genes that confer resistance to a specific bacterial species (Breidenstein et al., 2008; Fajardo et al., 2008; Mori et al., 2008; Tamae et al., 2008), and are not the result of any contamination by antibiotic resistance genes. Throughout this chapter, only those genes that have already been acquired by human/animal-linked microbiotas (pathogens or commensals) will be considered as pollutant resistance genes.

The main cause of environmental pollution by antibiotic resistance genes results from the release of residues from houses, hospitals, and farms, together with the use of wastes containing these compounds as fertilizers in agriculture. It is important to note that these residues usually contain both antibiotics and resistant bacteria (Kümmerer and Henninger, 2003). In other words, they contain the genes for adaptation (resistance genes) and the selecting agent (the antibiotic), in such a way that the maintenance and eventual spread of resistance by the contact of these wastes



**FIGURE 9.2 Different fate of contamination by antibiotics and by antibiotic resistance genes.** Antibiotics are chemical compounds that are degraded by time and diluted across space. Their diffusion in natural ecosystems produce a reduction in their concentration and, if there are not more pollution events, the contaminant will disappear sooner or later (a). Contrary to this situation, antibiotic resistance genes are autoreplicative elements, so that their concentration can increase in the presence of antibiotics and eventually can travel across long distances to occupy environments where they were not originally released using wild animals as vectors (b). Antibiotic contamination are shown in orange, and pollution by antibiotic resistance determinants are shown in red.

with natural populations of environmental bacteria is enhanced. Studies in sediments located nearby cities and sewage tributaries have shown that the presence of contaminant resistance genes is ubiquitous and the amount of these genes is much higher than that found in pristine environments (Pei et al., 2006). Nevertheless, as stated above, pristine environments without any historical record of contamination by antibiotics also harbor antibiotic resistance genes. This suggests that contamination could increase resistance, but resistance can persist and eventually spread even in the absence of pollution with antibiotics.

To understand this apparent paradox, we must take into consideration that the behavior in natural ecosystems of contaminating antibiotic resistance genes is very different from the situation observed for any other pollutant (Fig. 9.2). The release of a chemical pollutant in any given environment produces a gradient of contamination in time and space. The gradient in the space depends on the environment where pollution occurs (soil or water) or the intrinsic diffusion properties of the pollutant (mainly, its solubility). Although the concentration of the pollutant might be locally higher than at the point of contamination [e.g., active adsorption at sediments (Xu and Li, 2010)], the total amount of pollutant cannot be higher than released. The concentration gradient along time depends on the degradation of the pollutant in natural ecosystems, including physicochemical and biological degradation processes. It is thus expected that, for any type of pollution, if the release of the contaminant ceases, pollution will decrease and eventually disappear (although some chemical compounds are extremely resilient to degradation).

In sharp contrast with this situation, contaminant-resistant genes are autoreplicative pollutants, such that their concentration can increase if there exists an appropriate selective force. In addition, they can travel for long distances



(e.g., in the microbiota of birds; see below) without reduction in their concentration. In other words, unlike contamination by chemical compounds (including antibiotics), the maintenance of pollutant resistance genes in natural ecosystems does not depend on their constant release, since the host bacteria can grow and the genes, which are present in gene transfer units, can spread among several bacterial species in different habitats. In this regard, it has been described that identical antibiotic resistance genes have been found in disconnected aquatic systems (Picao et al., 2008). The finding of the same resistance elements, in different geographical allocations and in different microorganisms, suggests that human interventions, not necessarily involving contamination, may contribute to accelerate their spread. For instance, it is known that the traffic of ships around the world favors the dissemination of bacteria even between different oceans and continents (Ruiz et al., 2000). In a global world, with constant interchange of people and goods, resistance that originated in areas with high use of antibiotics will sooner or later invade comparatively clean environments. Other elements unlinked to human activities can also favor the dissemination of resistance genes. This is the case with the migration of wild animals harboring resistant bacteria, which allows this dissemination across long distances (Poeta et al., 2008, 2009; Sjolund et al., 2008) and enables the presence of antibiotic resistance genes in places with very low or even no human activities.

One important issue concerning pollutant resistance genes is that they are encoded in gene transfer units (Baquero, 2004). Chromosomally encoded antibiotic resistance genes can be enriched in the presence of antibiotics because of the enrichment of the bacterial species harboring them. Since any given bacterial species can colonize a limited number of ecosystems, this can lead to the expansion of those genes just at those specific ecosystems. If the human body is not one of these habitats, the enrichment of these intrinsically resistant microorganisms in natural ecosystems will not have a direct influence on human health. As an example, the potential selection of antibiotic producers such as *Streptomyces* as the consequence of the contamination with antibiotics will not directly impact human health since these organisms are not pathogens. An indirect effect might occur, however, if this enrichment favors the transfer of the resistance genes from the producers to a human pathogen, an issue that has not yet been analyzed in detail.

As discussed above, the enrichment of intrinsically resistant bacteria might be relevant in the case of opportunistic pathogens with an environmental origin (Alonso et al., 2001). However, these pathogens rarely infect healthy people, and the most frequent source of infection is the hospital or the patient's home, such that the impact of antibiotic pollution on the emergence of infections due to intrinsically resistant bacteria will likely be low. A different situation may occur for plasmid-encoded resistance determinants since their presence in gene transfer units allows their flow among different bacterial species, so that they can more easily colonize different ecosystems, including the human host. In this regard, we must consider the integration of a chromosomally encoded resistance determinant into a gene transfer unit as the hallmark that allows the dissemination of this determinant among human pathogens. One example of this situation has been described for *qnr* genes. These quinolone resistance determinants are present in plasmids in Enterobacteriaceae (Robicsek et al., 2006; Strahilevitz et al., 2009). Their origin is found in some species of water-dwelling microorganisms in which they are chromosomally encoded (Poirel et al., 2005a; Sanchez et al., 2008). The presence of a *qnr*-encoded plasmid in the

environmental nonpathogenic bacteria *Aeromonas* (Cattoir et al., 2008) has recently been described. The finding of the same plasmid in another isolate of *Aeromonas allosaccharophila* to wildlife is an important risk for environmental health. The chances for this transfer increase when agricultural manuring includes fecal material from livestock operations and urban areas that contain multiresistant enteric bacteria (Blanco et al., 2009). The finding in seagull feces of a high number of multidrug resistant *Escherichia coli* strains harboring well-known  $\beta$ -lactamase genes (Simoes et al., 2010) indicates that, once resistance genes are released in natural ecosystems, several vectors contribute to their dissemination, even between different continents without the need of a geographical connectivity with the original contamination source. The presence of antibiotic-resistant bacteria on the microbiota of avian scavengers, such as vultures, which consume stabled livestock carrion, likely containing antibiotics and resistance elements, further support the role that birds may have on the dissemination of resistance at long distances (Blanco et al., 2007).

#### 9.4 MECHANISMS OF MAINTENANCE AND SPREAD OF RESISTANCE GENES IN NATURAL ECOSYSTEMS

As discussed above, the simultaneous pollution by antibiotics and resistance genes leads to the local enrichment of pollutant resistance genes, enhanced by the presence of the antibiotics that both select the resistance organisms and favor their dissemination by a second-order selection process (Fig. 9.1) triggered by the presence of the selector (Salysers and Amabile-Cuevas, 1997; Thomas and Nielsen, 2005). In the absence of antibiotics, the concentration of pollutant resistance genes harbored in gene transfer units diminishes (Gonzalo et al., 1989). One good example of this situation is the treatment of some fish diseases in aquaculture. When an important bacterial outbreak occurs, large amounts of antibiotics are used, leading to an increase (Picao et al., 2008) from a lake geographically distant from the place where the first isolate was recovered indicates that the integration of resistance genes in gene transfer units allows their efficient spread in natural ecosystems, an issue already established for several other resistance determinants (Martinez et al., 2007).

Contrasting the situation with chemical pollutants, in which the evolution of the contamination depends on the physicochemical characteristics of the compound and its degradation (either by physicochemical or biological processes) in natural ecosystems, the evolution of pollution by resistance genes depends on the capability for colonizing natural environments of the bacteria that host them and on their transfer among different bacterial species. This situation is analogous to the introduction of an alien species into a new habitat in which case the spread depends on the adaptability of this species to the novel environment and on the presence of competitors. An example of this situation has been the introduction of rabbits in Australia, which rendered an explosive expansion of the lagomorphs on that continent (Cowan and Tyndale-Biscoe, 1997). Introduction of pollutant antibiotic resistance genes does not produce such a drastic effect. However, it is clear that these autoreplicative pollutants can be maintained and are able to expand their presence in noncontaminated environments and even to environments without a high load of antibiotics. In agreement with this issue, the analysis of historical soils has

demonstrated that there is an increasing prevalence of antibiotic resistance elements in these ecosystems since the antibiotics were introduced for therapy (Knapp et al., 2010). As stated above, this includes pristine environments such as the Antarctic Ocean (De Souza et al., 2006), the gut microbiota from isolated human populations that have not been in contact with antibiotics (Bartoloni et al., 2009), and microbiotas from wild animals (Livermore et al., 2001; Rolland et al., 1985). As rightly stated by Blanco et al. (2009), the transfer of bacterial resistance in the prevalence of resistance genes in the water of the vicinity of the containment enclosure. However, when the outbreak is over and the use of antibiotic is restored to normal levels, the amount of bacteria carrying antibiotic resistance plasmids diminishes considerably. The analysis of resistance in animals living in areas with dense human populations in comparison with those living in nonpopulated areas demonstrate this trend (Allen et al., 2010). For example, 90% bacterial isolates from mice and voles analyzed in a densely populated region of rural England were resistant to  $\beta$ -lactams (Gilliver et al., 1999), whereas fecal Enterobacteriaceae obtained in Finland (a much less populated area) from wild elk, deer, and voles were mostly susceptible to antibiotics (Osterblad et al., 2001). Likewise, it has been found that baboons and apes living in contact with humans and having daily contact with unprocessed human refuse harbor more antibiotic-resistant bacteria than those living in regions far away from human activities (Rolland et al., 1985; Rwego et al., 2008). All these observations fit with the idea that the major source for the pollution by resistance genes is human activity and that in the absence of this activity resistance might eventually disappear. This concept has been applied to the clinical world in order to replace resistant populations by susceptible ones by changing the antibiotics used in therapy (Austin et al. 1999). Although the strategy of drug removal seems to have some success on occasions (Guillemot et al., 2005; Seppala et al., 1997), in most cases, resistance diminishes but does not disappear. In some other cases, removing the antibiotics does not drastically alter the incidence of resistance. For instance, it has been recently shown that a 2-year discontinuation in the use of trimethoprim had not reduced the *E. coli* resistance rates to this compound in Sweden (Sundqvist et al., 2010). This stability of resistance in the absence of direct selection pressure is likely due to the spread of trimethoprim resistance genes in several different bacteria and mobile elements, which frequently harbor other resistance determinants that might serve for co-selecting resistance to trimethoprim (see below).

Similarly, and although it is clear that pristine environments contain lower amounts of resistance genes, it has been demonstrated that these ecosystems might contain the same resistance elements currently present in human pathogens. In other words, they can harbor pollutant resistance genes in the absence of both direct contamination and the selective force exerted by the antibiotics (Pallecchi et al., 2008). Examples of this situation are the finding of resistance genes in bacteria obtained from remote human populations (Bartoloni et al., 2009; Grenet et al., 2004) or in wild animals despite the fact that they do not have any known contact with antibiotics (Gilliver et al., 1999; Livermore et al., 2001), indicating that total eradication of resistance genes is difficult if not impossible.

As stated above, resistance genes are replicative elements, and they will disappear only if the bacterial populations harboring them are out competed by susceptible partners. Indeed, it has been widely accepted that acquisition of resistance confers a fitness cost (Andersson and Levin, 1999; Bouma and Lenski, 1988; Dahlberg and

Chao, 2003) and in the absence of selection, their susceptible partners might displace resistant bacteria. However, this statement presents some caveats because available data obtained mainly from the study of human and animal bacterial pathogens indicates that the rate of loss of resistance at the community level is low (Andersson and Hughes, 2010). The above-mentioned finding of the same resistance genes in bacterial pathogens and in environments without any history of antibiotic contamination indicates that, like in human-linked habitats, the resistance determinants are resilient for their elimination in natural ecosystems, even in the absence the selective pressure of antibiotics (Pallecchi et al., 2008).

To understand the reasons for this persistence, some issues must be taken into consideration. The first element that may contribute to the persistence of pollutant resistance genes in natural ecosystems is their presence in mobile genetic elements, which are “easy to get” and “hard to lose.” The main cause of this phenomenon is that lateral transfer of resistance genes between bacteria of different species, genera, or even families occurs easily and frequently in nature. Many examples of identical copies of the same resistance gene distributed among distantly related bacteria have been described. For example, the gene *tetM* can be found in a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Roberts et al., 1996; Salyers and Shoemaker, 1996; Salyers et al., 1995), indicating the promiscuity of the elements carrying the resistance genes among a broad range of hosts. It is important to mention that broad-host-range plasmids are ubiquitous in environmental bacteria (Götz et al., 1996), indicating that their presence does not necessarily compromise the fitness of their hosts.

One of the reasons for the persistence of gene transfer units, even in the absence of selective pressure, is the structure of these elements themselves. For example, many plasmids, including those carrying resistance genes, encode toxin–antitoxin systems (Hayes, 2003). These systems are formed by a bacterial killer (the toxin) and an antitoxin that binds the toxin, thereby precluding its activity. The antitoxin is less stable than the toxin, such that its constant production is needed to avoid cell death. If the bacterial cell loses the plasmid, the antitoxin is rapidly degraded, but the toxin remains for sufficient time to kill the bacterium. Because of this, toxin–antitoxin systems are very efficient elements for the stabilization of plasmids in their host cells. Another relevant factor for the stabilization of resistant plasmid is co-selection (Dang et al., 2006; Stepanauskas et al., 2006). Resistance plasmids frequently harbor several different resistance genes such that selection for one of these genes will co-select the others. This is not necessarily relevant in the case of noncontaminated environments. However, resistance plasmids can also harbor determinants with an adaptive value for colonizing natural ecosystems such as siderophores, toxins, colonization factors, microcins, or resistance to biocides or heavy metals (De Souza et al., 2006; Dhakephalkar and Chopade, 1994; Gonzalo et al., 1989; Hermansson et al., 1987; Martinez et al., 1989; Martinez and Perez-Diaz, 1990; Martinez-Suarez et al., 1987; Stepanauskas et al., 2006), which might favor co-selection of resistance in natural ecosystems. Antibiotic resistance genes are frequently found forming clusters in integrons. Integrons are gene capture units capable of recruiting several different gene cassettes (Mazel, 2006). The backbone of type I integrons contains a determinant that confers resistance to quaternary ammonium compounds, a commonly used industrial biocide and thus industrial pollution is one important issue for co-selection of resistance genes in natural ecosystems (Biyela et al., 2004; Gaze et al., 2005; Wright et al., 2008).

A final consideration concerns the effect of resistance on bacterial fitness. Although in several occasions acquisition of resistance produces a metabolic burden, which diminishes the competitiveness of resistant bacteria, the fitness costs of antibiotic resistance is not always the same. Indeed, it has been described that some resistance mechanisms have no cost for bacteria (Balsalobre and de la Campa, 2008). In this case the resistant microorganisms should not be out competed by their susceptible counterparts. Furthermore, the effect of resistance on bacterial fitness can be specific for the genetic background and for the host environment. As an example, the same *gyrA* mutation that leads to quinolone resistance reduces the virulence of one strain of *Campylobacter jejuni* but has the opposite effect on another strain (Luo et al., 2005), indicating that, in some instances, resistance might increase bacterial fitness, depending on the genetic background of the host. The analysis of rifampin mutants of *Bacillus subtilis* has demonstrated as well that some mutations produce a metabolic rewiring that allows bacteria to more efficiently use some substrates than the susceptible strains (Maughan et al., 2004), further supporting the notion that resistance might increase fitness in some specific habitats. Even in the cases in which resistance renders strong fitness costs that diminish the ecological competitiveness of resistant bacteria, stabilization is allowed by the acquisition of secondary mutations (compensatory mutations) that compensate the costs associated to resistance (Bjorkman et al., 2000; Lofmark et al., 2008; Paulander et al., 2007).

Altogether, these factors allow the stabilization of pollutant resistance genes both in contaminated and in pristine environments, indicating that the release of these elements into natural ecosystems is likely a one-way road. Studies on the effects on antibiotic resistance of the ban in the use avoparcin for farming purposes demonstrates a decline in the prevalence of resistance organisms in the animals. However, a reversal to a situation of full susceptibility in all isolates has not been observed (Aarestrup, 2005; Aarestrup et al., 2001). We can predict that a similar pattern will likely be observed in natural ecosystems.

The effects of pollution by antibiotics and by resistance genes harbored by gene transfer units on the genetic structure of bacterial populations is unknown, but it is likely to be irreversible and may impact the future evolution of environmental microbiota with consequences for human health that are difficult to predict.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank MICINN BIO2008-00090 and EU KBBE-227258 and HEALTH-F3-2010-241476 for supporting our research.

## REFERENCES

- Aarestrup FM (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96:271–281.
- Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F (2001). Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2054–2059.

- Adachi H, Ishiguro M, Imajoh S, Ohta T, Matsuzawa H (1992). Active-site residues of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2 from *Escherichia coli*: Similarity in catalytic mechanism to class A beta-lactamases. *Biochemistry* 31:430–437.
- Aendekerk S, Diggle SP, Song Z, Hoiby N, Cornelis P, Williams P, Camara M (2005). The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* 151:1113–1125.
- Ainsa JA, Perez E, Pelicic V, Berthet FX, Gicquel B, Martin C (1997). Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: Characterization of the aac(2')-Ic gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac(2')-Id gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 24:431–441.
- Alekshun MN, Levy SB (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128:1037–1050.
- AQ3 Allen HK, et al. (2009). Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA Cell Biol.*
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8:251–259.
- Alonso A, Sanchez P, Martinez JL (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 3:1–9.
- Alonso A, Morales G, Escalante R, Campanario E, Sastre L, Martinez JL (2004). Over-expression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* 53:432–434.
- Aminov RI (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol* 11:2970–2988.
- Andersson DI, Levin BR (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2:489–493.
- Andersson DI, Hughes D (2010). Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8:260–271.
- Argoudelis AD, Coats JH (1969). Microbial transformation of antibiotics. II. Phosphorylation of lincomycin by *Streptomyces* species. *J Antibiot (Tokyo)* 22:341–343.
- AQ4 Austin DJ, Kristinsson KG, Anderson RM (1999). The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1152–1156.
- Balsalobre L, de la Campa AG (2008). Fitness of *Streptococcus pneumoniae* fluoroquinolone-resistant strains with topoisomerase IV recombinant genes. *Antimicrob Agents Chemother* 52:822–830.
- Baquero F (2004). From pieces to patterns: Evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2:510–518.
- Baquero F, Martinez JL, Canton R (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 19:260–265.
- Baquero F, Alvarez-Ortega C, Martinez JL (2009). Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ Microbiol Rep* 1:469–476.
- Bartoloni A, et al. (2009). Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *Int J Antimicrob Agents* 33:125–129.
- Baya AM, Brayton PR, Brown VL, Grimes DJ, Russek-Cohen E, Colwell RR (1986). Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. *Appl Environ Microbiol* 51:1285–1292.
- Benton MJ (2010). Evolutionary biology: New take on the Red Queen. *Nature* 463:306–307.

- Benveniste R, Davies J (1973). Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:2276–2280.
- Biyela PT, Lin J, Bezuidenhout CC (2004). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water Sci Technol* 50:45–50.
- Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI (2000). Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science* 287:1479–1482.
- Blanco G, et al. (2007). Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ Microbiol* 9:1738–1749.
- Blanco G, Lemus JA, Grande J (2009). Microbial pollution in wildlife: Linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environ Res* 109:405–412.
- Bouma JE, Lenski RE (1988). Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature* 335:351–352.
- Bradford PA (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14:933–951.
- Brandt KK, Sjöholm OR, Krogh KA, Halling-Sørensen B, Nybroe O (2009). Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environ Sci Technol* 43:2963–2968.
- Breidenstein EB, Khaira BK, Wiegand I, Overhage J, Hancock RE (2008). Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4486–4491.
- Brown MG, Balkwill DL (2009). Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb Ecol* 57:484–493.
- Bush K, Jacoby GA (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:969–976.
- Cabello FC (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8:1137–1144.
- Canton R, Coque TM (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9:466–475.
- Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* 14:231–237.
- Clay K, Kover PX (1996). The Red Queen Hypothesis and plant/pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* 34:29–50.
- Cowan PE, Tyndale-Biscoe CH (1997). Australian and New Zealand mammal species considered to be pests or problems. *Reprod Fertil Dev* 9:27–36.
- Cundliffe E (1992). Self-protection mechanisms in antibiotic producers. *Ciba Found Symp* 171:199–208.
- D'Acosta VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311:374–377.
- Dahlberg C, Chao L (2003). Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 165:1641–1649.
- Dang H, Song L, Chen M, Chang Y (2006). Concurrence of *cat* and *tet* genes in multiple antibiotic-resistant bacteria isolated from a sea cucumber and sea urchin mariculture farm in China. *Microb Ecol* 52:634–643.
- Datta N, Hughes VM (1983). Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 306:616–617.

- Davies J (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264:375–382.
- Davies JE (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp* 207:15–27.
- Davies J (2006). Are antibiotics naturally antibiotics? *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:496–499.
- Davies J, Spiegelman GB, Yim G (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* 9:445–453.
- De Souza MJ, Nair S, Loka Bharathi PA, Chandramohan D (2006). Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology* 15:379–384.
- de Souza SM, Vasconcelos EC, Dziedzic M, de Oliveira CM (2009). Environmental risk assessment of antibiotics: An intensive care unit analysis. *Chemosphere* 77:962–967.
- Dhakephalkar PK, Chopade BA (1994). High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. *Biometals* 7:67–74.
- Dotsch A, Becker T, Pommerenke C, Magnowska Z, Jansch L, Haussler S (2009). Genome-wide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2522–2531.
- Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Poole K (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180:5443–5447.
- Fajardo A, Martinez JL (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol* 11:161–167.
- Fajardo A, et al. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS ONE* 3:e1619.
- Fajardo A, Linares JF, Martinez JL (2009). Towards an ecological approach to antibiotics and antibiotic resistance genes. *Clin Microbiol Infect* 15:14–16.
- Ferber D (2003). Antibiotic resistance. WHO advises kicking the livestock antibiotic habit. *Science* 301:1027.
- Fleming A (1944). Penicillin: The Robert Campbell Oration. *Ulster Med J* 13:95–122.
- Gaze WH, Abdoulsam N, Hawkey PM, Wellington EM (2005). Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1802–1807.
- Gerba CP, Smith JE, Jr. (2005). Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Qual* 34:42–48.
- Gilliver MA, Bennett M, Begon M, Hazel SM, Hart CA (1999). Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature* 401:233–234.
- Gonzalo MP, Arribas RM, Latorre E, Baquero F, Martinez JL (1989). Sewage dilution and loss of antibiotic resistance and virulence determinants in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 50:93–96.
- Götz A, et al. (1996). Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62:2621–2628.
- Grenet K, et al. (2004). Antibacterial resistance, Wayampis Amerindians, French Guyana. *Emerg Infect Dis* 10:1150–1153.
- Grimes DJ, Singleton FL, Colwell RR (1984). Allogenic succession of marine bacterial communities in response to pharmaceutical waste. *J Appl Bacteriol* 57:247–261.
- Guillemot D, et al. (2005). Reduction of antibiotic use in the community reduces the rate of colonization with penicillin G-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 41:930–938.



- Hayes F (2003). Toxins-antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301:1496–1499.
- Hermansson M, Jones GW, Kjelleberg S (1987). Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation, and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. *Appl Environ Microbiol* 53:2338–2342.
- Hu X, Zhou Q, Luo Y (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environ Pollut* 158:2992–2998.
- Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A (2002). Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3045–3049.
- Isken S, de Bont JA (1996). Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J Bacteriol* 178:6056–6058.
- Karci A, Balcioglu IA (2009). Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Sci Total Environ* 407:4652–4664.
- Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PA, Graham DW (2010). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol* 44:580–587.
- Knox JR, Moews PC, Frere JM (1996). Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chem Biol* 3:937–947.
- Kohler T, van Delden C, Curty LK, Hamzehpour MM, Pechere JC (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:5213–5222.
- Kümmerer K (2004). Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother* 54:311–320.
- Kümmerer K (2009a). Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part II. *Chemosphere* 75:435–441.
- Kümmerer K (2009b). Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part I. *Chemosphere* 75:417–434.
- Kümmerer K, Henninger A (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin Microbiol Infect* 9:1203–1214.
- Lambert T, Ploy MC, Denis F, Courvalin P (1999). Characterization of the chromosomal aac(6′)-Iz gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2366–2371.
- Laskaris P, Tolba S, Calvo-Bado L, Wellington L (2010). Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. *Environ Microbiol* 12:783–796.
- Levy SB (1998). Multidrug resistance—A sign of the times. *N Engl J Med* 338:1376–1378.
- Levy SB, Marshall B (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat Med* 10:S122–129.
- Levy SB, O’Brien TF (2005). Global antimicrobial resistance alerts and implications. *Clin Infect Dis* 41:S219–220.
- Li XZ, Zhang L, Poole K (1998). Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J Bacteriol* 180:2987–2991.
- Lietman PS (1972). Pharmacologic effects on developing enzyme systems. *Fed Proc* 31:62–64.
- Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19484–19489.
- Lindberg F, Normark S (1986). Contribution of chromosomal beta-lactamases to beta-lactam resistance in enterobacteria. *Rev Infect Dis* 8:S292–304.

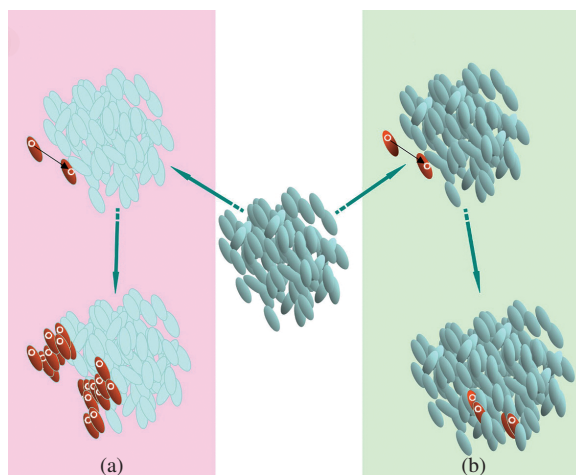
- Lindberg RH, Bjorklund K, Rendahl P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BA (2007). Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water Res* 41:613–619.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22:582–610.
- Livermore DM, Woodford N (2006). The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 14:413–420.
- Livermore DM, et al. (2001). Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environ Microbiol* 3:658–661.
- Lofmark S, Jernberg C, Billstrom H, Andersson DI, Edlund C (2008). Restored fitness leads to long-term persistence of resistant *Bacteroides* strains in the human intestine. *Anaerobe* 14:157–160.
- Looney WJ, Narita M, Muhlemann K (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* 9:312–323.
- Luo N, Pereira S, Sahin O, Lin J, Huang S, Michel L, Zhang Q (2005). Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:541–546.
- Macinga DR, Rather PN (1999). The chromosomal 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*: Physiological functions and genetic regulation. *Front Biosci* 4:D132–140.
- MacLeod C (1912). Electric metallic colloids and their therapeutical applications. *Lancet* 179:322.
- Marshall CG, Lessard IA, Park I, Wright GD (1998). Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2215–2220.
- Martinez JL (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321:365–367.
- Martinez JL (2009a). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157:2893–2902.
- Martinez JL (2009b). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* 276:2521–2530.
- Martinez JL, Baquero F (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15:647–679.
- Martinez JL, Perez-Diaz JC (1990). Cloning of the determinants for microcin D93 production and analysis of three different D-type microcin plasmids. *Plasmid* 23:216–225.
- Martinez JL, Cercenado E, Baquero F (1989). Aerobactin production and plasmid distribution in *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett* 51:41–44.
- Martinez JL, Baquero F, Andersson DI (2007). Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 5:958–965.
- Martinez JL, Sanchez MB, Martinez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, Alvarez-Ortega C (2009a). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 33:430–449.
- Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martinez-Solano L, Sanchez MB (2009b). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33:44–65.
- Martinez-Suarez JV, Martinez JL, Lopez de Goicoechea MJ, Perez-Diaz JC, Baquero F, Meseguer M, Linares J (1987). Acquisition of antibiotic resistance plasmids in vivo by extraintestinal *Salmonella* spp. *J Antimicrob Chemother* 20:452–453.

- Maughan H, Galeano B, Nicholson WL (2004). Novel *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on *Bacillus subtilis*: global effects on growth, competence, sporulation, and germination. *J Bacteriol* 186:2481–2486.
- Mazel D (2006). Integrons: Agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4:608–620.
- McArthur JV, Tuckfield RC (2000). Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: Effects of industrial pollution. *Appl Environ Microbiol* 66:3722–3726.
- McGowan JE Jr (2006). Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: Multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control* 34:S29–37.
- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 40:443–465.
- Miteva VI, Sheridan PP, Brenchley JE (2004). Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep greenland glacier ice core. *Appl Environ Microbiol* 70:202–213.
- Mori T, Mizuta S, Suenaga H, Miyazaki K (2008). Metagenomic screening for bleomycin resistance genes. *Appl Environ Microbiol* 74:6803–6805.
- Naslund J, Hedman JE, Agestrand C (2008). Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquat Toxicol* 90:223–227.
- Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y (2005). Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis* 18:306–313.
- Nikaido H (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382–388.
- Nikaido H (1998a). Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 27:S32–41.
- Nikaido H (1998b). Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr Opin Microbiol* 1:516–523.
- O'Connor GA, Elliott HA, Basta NT, Bastian RK, Pierzynski GM, Sims RC, Smith JE Jr (2005). Sustainable land application: An overview. *J Environ Qual* 34:7–17.
- Osterblad M, Norrdahl K, Korpimäki E, Huovinen P (2001). Antibiotic resistance. How wild are wild mammals? *Nature* 409:37–38.
- Pallecchi L, Bartoloni A, Paradisi F, Rossolini GM (2008). Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: Mechanisms and implications. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6:725–732.
- Pang Y, Brown BA, Steingrube VA, Wallace RJ Jr, Roberts MC (1994). Tetracycline resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1408–1412.
- Paterson DL, Bonomo RA (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18:657–686.
- Paulander W, Maisnier-Patin S, Andersson DI (2007). Multiple mechanisms to ameliorate the fitness burden of mupirocin resistance in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 64:1038–1048.
- Payie KG, Rather PN, Clarke AJ (1995). Contribution of gentamicin 2'-N-acetyltransferase to the O acetylation of peptidoglycan in *Providencia stuartii*. *J Bacteriol* 177:4303–4310.
- Pei R, Kim SC, Carlson KH, Pruden A (2006). Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res* 40:2427–2435.
- Pereira-Leal JB, Levy ED, Teichmann SA (2006). The origins and evolution of functional modules: Lessons from protein complexes. *Philos Trans R Soc B* 361:507–517.
- Picao RC, Poirel L, Demarta A, Silva CS, Corvaglia AR, Petrini O, Nordmann P (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother* 62:948–950.

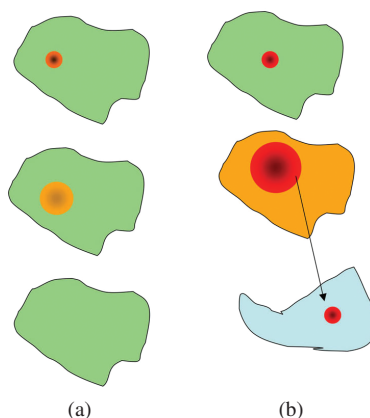
- Poeta P, et al. (2008). Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl Environ Microbiol* 74:7439–7441.
- Poeta P, et al. (2009). Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *J Basic Microbiol* 49:584–588.
- Poirel L, Liard A, Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P (2005a). Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 56:1118–1121.
- Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P (2005b). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3523–3525.
- Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. *Environ Sci Technol* 40:7445–7450.
- Ramos JL, et al. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56:743–768.
- Ren Q, Paulsen IT (2005). Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Comput Biol* 1:e27.
- Roberts MC, Chung WO, Roe DE (1996). Characterization of tetracycline and erythromycin resistance determinants in *Treponema denticola*. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1690–1694.
- Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 6:629–640.
- Rolland RM, Hausfater G, Marshall B, Levy SB (1985). Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: Increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Appl Environ Microbiol* 49:791–794.
- Ruiz GM, Rawlings TK, Dobbs FC, Drake LA, Mullady T, Huq A, Colwell RR (2000). Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408:49–50.
- Rwego IB, Isabirye-Basuta G, Gillespie TR, Goldberg TL (2008). Gastrointestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Conserv Biol* 22:1600–1607.
- Sader HS, Jones RN (2005). Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents* 25:95–109.
- Saier MH Jr, Paulsen IT (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* 12:205–213.
- Salyers AA, Amabile-Cuevas CF (1997). Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* 41:2321–2325.
- Salyers AA, Shoemaker NB (1996). Resistance gene transfer in anaerobes: New insights, new problems. *Clin Infect Dis* 23:S36–43.
- Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY (1995). Conjugative transposons: An unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* 59:579–590.
- Sanchez MB, Hernandez A, Rodriguez-Martinez JM, Martinez-Martinez L, Martinez JL (2008). Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol* 8:148.
- Sanchez MB, Hernandez A, Martinez JL (2009). *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol* 4:655–660.
- Seppala H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J, Muotiala A, Helenius H, Lager K, Huovinen P (1997). The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *N Engl J Med* 337:441–446.

- Shaw WV (1983). Chloramphenicol acetyltransferase: Enzymology and molecular biology. *CRC Crit Rev Biochem* 14:1–46.
- Shaw KJ, et al. (1992). Characterization of the chromosomal aac(6')-Ic gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1447–1455. AQ5
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57:138–163.
- Silver S, Phung LT (1996). Bacterial heavy metal resistance: New surprises. *Annu Rev Microbiol* 50:753–789.
- Simoes RR, Poirel L, Da Costa PM, Nordmann P (2010). Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 16:110–112.
- Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M (2003). Antibiotic resistance—The interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis*, 3:47–51.
- Sjolund M, et al. (2008). Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerg Infect Dis* 14:70–72.
- Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silbergeld EK, Morris JG Jr (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6434–6439.
- Spicuzza L, Sciuto C, Vitaliti G, Di Dio G, Leonardi S, La Rosa M (2008). Emerging pathogens in cystic fibrosis: Ten years of follow-up in a cohort of patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:191–195.
- Stepanauskas R, Glenn TC, Jagoe CH, Tuckfield RC, Lindell AH, King CJ, McArthur JV (2006). Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environ Microbiol* 8:1510–1514.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22:664–689.
- Sundqvist M, et al. (2010). Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use. *J Antimicrob Chemother* 65:350–360.
- Tamae C, et al. (2008). Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190:5981–5988.
- Thomas CM, Nielsen KM (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3:711–721.
- Thorburn AL (1983). Paul Ehrlich: Pioneer of chemotherapy and cure by arsenic (1854–1915). *Br J Vener Dis* 59:404–405. AQ6
- Twentyman PR (1997). Transport proteins in drug resistance: Biology and approaches to circumvention. *J Intern Med Suppl* 740:133–137.
- Venglovsky J, Sasakova N, Placha I (2009). Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour Technol* 100:5386–5391.
- Waksman SA, Woodruff HB (1940). The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. *J Bacteriol* 40:581–600.
- Wright GD (2007). The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 5:175–186.
- Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, Stepanauskas R, Stokes HW, McArthur JV (2008). Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: Class I integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J* 2:417–428.
- Xie X, Zhou Q, Bao Q, He Z, Bao Y (2010). Genotoxicity of tetracycline as an emerging pollutant on root meristem cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Toxicol*, in press. AQ7

- Xu XR, Li XY (2010). Sorption and desorption of antibiotic tetracycline on marine sediments. *Chemosphere* 78:430–436.
- Yates AL (1939). The action of sulphonamide in infective colds. *Can Med Assoc J* 41:275–278.
- Yim G, Wang HH, Davies J (2006a). The truth about antibiotics. *Int J Med Microbiol* 296:163–170.
- Yim G, de La Cruz F, Spiegelman GB, Davies J (2006b). Transcription modulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promoters by sub-MIC levels of rifampin. *J Bacteriol* 188:7988–7991.
- Yim G, Wang HH, Davies J (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc B* 362:1195–1200.
- Yiruhan, et al. (2010). Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. *Environ Pollut* 158:2350–2358.



**FIGURE 9.1 Second-order selection of transfer of antibiotic resistance genes in the presence of antibiotics.** Once an antibiotic resistance gene is present in a gene transfer element, it can be spread among different hosts. Nevertheless, carrying this element will produce a fitness cost, so that in the absence of antibiotics' selective pressure, resistant bacteria, including those that have received the resistance gene by horizontal gene transfer from the original host, will be out competed by the susceptible ones (a). Under circumstances of no selection, acquisition of novel genetic elements is not adaptive. In the presence of antibiotics, however, the growth of susceptible bacteria will be inhibited, and only those containing resistance genes (either the original ones or those that have received the resistance determinant by gene transfer) will be able to grow (b), thus favoring the dissemination of these resistance determinants.



**FIGURE 9.2 Different fate of contamination by antibiotics and by antibiotic resistance genes.** Antibiotics are chemical compounds that are degraded by time and diluted across space. Their diffusion in natural ecosystems produce a reduction in their concentration and, if there are not more pollution events, the contaminant will disappear sooner or later (a). Contrary to this situation, antibiotic resistance genes are autoreplicative elements, so that their concentration can increase in the presence of antibiotics and eventually can travel across long distances to occupy environments where they were not originally released using wild animals as vectors (b). Antibiotic contamination is shown in orange, and pollution by antibiotic resistance determinants are shown in red.